N° d'ordre : 402

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S.
A. O. 8422

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

## L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

## DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Jean-Pierre CARDE**

ATTACHÉ DE RECHERCHE AU C. N. R. S.

---

**Etude des cellules de Strasburger de l'aiguille du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) : origine, ultrastructure, rôle.**

TOME I : TEXTE

---

*Soutenue le 24 mai 1973, devant la Commission d'Examen :*

M. J. VINDT, Professeur, Directeur de l'U.E.R. de Biologie..... *Président.*

M^lle^ A. M. CATESSON, Professeur à l'Université de Paris VI .....

MM. P. MAZLIAK, Professeur à l'Université de Paris VI ..... *Examinateurs*

J. EYMÉ, Professeur .....

M^me^ C. BERNARD-DAGAN, Docteur ès sciences.

— 1973 —

N° d'ordre : 402

N° D'ENREGISTREMENT AU C.N.R.S.

A. O. 8422

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

## L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

## DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Jean-Pierre CARDE**

ATTACHÉ DE RECHERCHE AU C. N. R. S.

---

**Etude des cellules de Strasburger de l'aiguille du Pin maritime (*Pinus pinaster* Ait.) : origine, ultrastructure, rôle.**

TOME I : TEXTE

---

*Soutenue le 24 mai 1973, devant la Commission d'Examen :*

| | |
|---|---|
| M. J. VINDT, Professeur, Directeur de l'U.E.R. de Biologie..... | *Président.* |
| M^lle A. M. CATESSON, Professeur à l'Université de Paris VI ..... | *Examinateurs* |
| MM. P. MAZLIAK, Professeur à l'Université de Paris VI ..... | |
| J. EYMÉ, Professeur ..... | |
| M^me C. BERNARD-DAGAN, Docteur ès sciences. | |

— 1973 —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

https://archive.org/details/IA41547309_0016

A LA MEMOIRE DE MON PERE

A MA FEMME

Il nous est agréable, avant de présenter les résultats de nos recherches, de remercier tous ceux qui se sont associés à la réalisation de ce travail et y ont participé.

C'est en premier lieu à Monsieur VINDT, Directeur de l'Unité de Biologie, que nous sommes redevable. Il nous a accueilli dans son service et nous a fourni tous les moyens matériels et l'assistance technique désirables. Il a su créer autour de lui l'ambiance favorable sans laquelle aucun travail scientifique ne saurait être réalisé. Son appui moral, ses encouragements, sa bienveillance à notre égard ont constitué pour nous autant de facteurs décisifs lors du démarrage effectif de nos recherches. Pour sa volonté sans cesse réaffirmée de maintenir un climat de dialogue indispensable, nous tenons à lui exprimer notre très vive gratitude.

Monsieur MAZLIAK, Professeur à l'Université de Paris VI, a accepté de nous parrainer à la Commission de Biologie et Physiologie végétales du C.N.R.S. Ses activités de recherches personnelles, dans un domaine original de la Physiologie cellulaire, s'écartent quelque peu de l'orientation qu'ont pris nos propres travaux. Néanmoins, il nous a fourni, à tous moments, les conseils et les appuis nécessaires, avec amabilité et compréhension. Nous tenons à lui rendre hommage pour les marques d'intérêt qu'il n'a cessé de nous prodiguer.

Mademoiselle CATESSON, Professeur à l'Université de Paris VI, a bien voulu s'intéresser à notre travail et lui donner une impulsion décisive . Sa participation très active à l'interprétation de nos résultats et à la réalisation du manuscrit nous honorent. Malgré ses activités scientifiques nombreuses, elle a eu à coeur de nous faire bénéficier de sa grande expérience et de sa compétence qui touche à des domaines très variés. Dans des conditions souvent difficiles, elle nous a aidé à exploiter correctement les résultats acquis. Nous ne saurions assez vivement lui témoigner notre reconnaissance.

Monsieur EYME nous a accueilli dans le laboratoire de Botanique de l'Université de Bordeaux I qu'il dirige et qui a servi de cadre à la préparation du matériel destiné à l'étude infrastructurale. Il nous a accordé tous les moyens pour la mener à bien et nous a fait bénéficier de sa vaste culture en matière de cytologie infrastructurale. Il va sans dire que les possibilités qu'il nous a offertes nous ont été précieuses et qu'il a grandement facilité notre tâche. Nous l'en remercions très sincèrement.

Nous attachons beaucoup de prix à la participation de Madame BERNARD-DAGAN à notre jury de thèse. Elle a su créer, puis animer avec beaucoup de dynamisme un groupe de recherche spécialisé dans un domaine d'investigations encore très peu connu. Ses idées originales, soutenues par un raisonnement rigoureux, nous ont été d'un grand secours. Son apport scientifique à notre travail ne doit pas conduire à minimiser ses qualités humaines de disponibilité, de dialogue et de compréhension. Qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude.

Nos observations infrastructurales ont été réalisées au Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Bordeaux I. Monsieur CAMBAR, Directeur du Centre et Monsieur GENDRE, Directeur Adjoint nous ont donné la possibilité, à l'aide du microscope électronique, d'aller plus loin dans la connaissance cytologique de notre matériel. L'étude ainsi effectuée constitue une partie essentielle de notre travail, et nous leur savons gré d'avoir pu nous donner les moyens de la réaliser.

Nous sommes redevables à beaucoup parmi nos camarades du Laboratoire de Biologie végétale, de Botanique et du Centre de Microscopie Electronique. La contribution de Michel GLEIZES à notre travail doit être soulignée. Nous voudrions que les recherches qu'il effectue, menées avec rigueur et conscience, mais entachées peut-être d'un excès de modestie, soient sanctionnées bientôt à leur juste valeur. Qu'il trouve ici l'expression de notre amicale gratitude.

Claude SUIRE, chargé de recherches au C.N.R.S., nous a guidé au début de nos recherches infrastructurales. Michel MERCIER et René LE MENN, assistants au Centre de Microscopie électronique nous ont très amicalement fait bénéficier de leur compétence.

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'indispensable apport de techniciens spécialisés. Madame LAHA a assuré la responsabilité de la réalisation des coupes ultra fines. Outre sa participation à cette activité, Madame PRADEILLE nous a efficacement assisté dans la réalisation matérielle de ce mémoire et de l'expérimentation qui l'a précédée.

Les tirages définitifs de planches photographiques sont l'oeuvre de Monsieur BARRE du Centre de Microscopie Electronique. Nous le remercions pour le soin qu'il a apporté à leur réalisation. Il ne nous faut pas oublier cependant la contribution très appréciable, mais plus ingrate, apportée par Messieurs PANZERI et SALAT.

Beaucoup se sentiront peut-être oubliés, mais ces pages n'ont pas pour but de dresser une liste exhaustive de ceux, nombreux, qui ont pris part à ce travail. Qu'ils sachent cependant que leur appui, matériel ou moral, a été apprécié le moment venu et que nous l'avons encore en mémoire.

# I N T R O D U C T I O N

Les particularités anatomiques des aiguilles des Conifères et plus spécialement de celles des Pinacées sont maintenant assez bien connues. On en a précisé les traits dominants : ces organes ne constituent pas de vraies feuilles mais possèdent une structure de tige ; l'épiderme fortement cutinisé et l'hypoderme souvent pluristratifié, le parenchyme plissé sous-jacent, le tissu de transfusion limité par un "endoderme" constituent autant d'aspects caractéristiques. Certains points sont cependant jusqu'à présent restés dans l'ombre. On sait bien peu de choses en particulier de l'ensemble cellulaire situé contre la partie libérienne des faisceaux, dont STRASBURGER a pour la première fois esquissé la description en 1891. Ces cellules, distinctes des éléments criblés, prennent intensément les colorants basiques, ce qui a conduit cet auteur à leur assigner un rôle dans la circulation des "matières albuminoïdes". Pour STRASBURGER, il s'agit là de cellules très comparables à celles que l'on observe dans les axes au contact des éléments criblés, dans le système parenchymateux vertical ou sur la marge des rayons horizontaux. HILL cependant en 1901 met l'accent sur une particularité importante des cellules albumineuses : leurs parois sont perforées de très nombreux "connecting threads", présents certes dans la plupart des autres types cellulaires de l'aiguille, mais ici particulièrement denses et regroupés le plus souvent dans des portions épaissies de la paroi.

Très curieusement, alors que les travaux sur le phloème des Angiospermes et, à un moindre degré, celui des Gymnospermes (1), se multiplient, ce n'est qu'en 1947 qu'HUBER met en évidence un certain nombre de faits nouveaux relatifs aux cellules de STRASBURGER : elles constituent un massif hétérogène ; les cellules vont en s'allongeant depuis la périphérie jusqu'au phloème, la rangée de cellules située contre ce dernier constituant en réalité un rayon libérien ; elles contiennent toutes une quantité surprenante de cytoplasme et de gros noyaux. Et HUBER établit un parallèle entre le système ligneux formé par le xylème des faisceaux et les trachéides de transfusion aplaties, responsable de l'équilibre hydrique de l'aiguille, et le système parenchymateux qui aboutit au phloème par l'intermédiaire des cellules albumineuses. Ce système serait responsable du transfert latéral des métabolites élaborés dans le mésophylle externe.

Les années 1960 voient se multiplier, et plus spécialement aux Etats-Unis, les recherches consacrées au phloème du tronc des Gymnospermes et aux tissus qui s'y rattachent. Ces travaux, effectués tout d'abord au microscope optique, ont une finalité taxinomique (58, 106, 206). Tous les auteurs s'en tiennent à la définition initiale de STRASBURGER : les cellules albumineuses sont denses, ont un noyau volumineux, ne synthétisent pas d'amidon et possèdent des communications très visibles avec les éléments criblés. SRIVASTAVA (1963) définit de façon systématique la disposition et l'importance des cellules albumineuses dans le tronc des Pinacées. L'étude au microscope électronique du développement des tubes criblés amène un certain nombre de chercheurs à préciser de façon occasionnelle les aspects infrastructuraux des cellules albumineuses caulinaires.

Ainsi EVERT et ALFIERI (1965), MURMANIS et EVERT (1965, 1966 et 1967), WOODING (1966), SRIVASTAVA et O'BRIEN (1966 a et b), SCHUMACHER (1967), ALFIERI et EVERT (1968 a et b) signalent, parmi les types cellulaires rencontrés dans le phloème, plusieurs caractéristiques qui paraissent être communes à un certain nombre de cellules ainsi décrites comme "albumineuses". ESAU (1969)

fait une revue très complète de ces différentes publications. Cependant, aucune des observations réalisées sur le phloème des tiges n'a permis de définir avec précision ce que sont les cellules de STRASBURGER. Ce type cellulaire, aux contours imprécis, est-il unique, ou bien au contraire polymorphe ? Retrouve-t-on dans les deux systèmes parenchymateux, système vertical et système horizontal des rayons, des cellules analogues ? Ou bien enfin peut-on envisager l'existence de plusieurs systèmes de cellules dont un seul peut-être serait constitué de cellules de STRASBURGER sensu stricto ?

Après HUBER, dont les observations datent de 1937, aucun travail notable n'a été effectué sur les aiguilles de Pin. Aucune étude histologique détaillée, et a fortiori ontogénique, ne leur a été consacrée. En 1960 cependant ZIEGLER et HUBER signalent une intense activité phosphatasique acide dans les cellules de STRASBURGER des aiguilles de Pinus silvestris (294). COILEAU (65) dans une étude systématique assez récente des feuilles de Picea ne signale même pas nommément la présence de cellules albumineuses. Après cette longue désaffection, les pseudophylles de Pin connaissent très récemment un regain d'intérêt. Successivement PARAMESWARAN (1971) en R.F.A. puis HARRIS (1972) aux U.S.A. et CAMPBELL (1972) en Grande-Bretagne décrivent certains aspects infrastructuraux du phloème de l'aiguille.

Celui-ci pour HARRIS est constitué, outre les éléments criblés, de cellules parenchymateuses banales et de cellules albumineuses : ces dernières ont un cytoplasme très dense et sont habituellement plus longues que les cellules parenchymateuses. Elles présentent des communications plasmodesmiques épaissies, d'une part avec les éléments criblés, d'autre part avec les cellules parenchymateuses. Cet auteur n'établit donc pas de distinction entre le phloème lui-même et le tissu albumineux qui lui est adjacent et semble considérer que les cellules albumineuses sont intégrées à l'ensemble du phloème. HARRIS signale, dans les éléments criblés du liber, la présence d'inclusions filamenteuses assimilées à de la protéine P. Cette observation a également été faite par PARAMESWAPAN (208) dans le phloème primaire.

CAMPBELL précise brièvement les rapports du tissu albumineux avec le phloème et en esquisse l'évolution ontogénique. Le fait caractéristique est la présence de très gros noyaux aussi bien dans les cellules jeunes que dans les cellules adultes. Ces noyaux peuvent avoir une longueur égale aux deux tiers de la cellule. Les cellules adultes peuvent élaborer une substance dense aux électrons, non identifiée, mais apparemment non polyphénolique ; les communications plasmodesmiques existant entre le phloème et les jeunes cellules albumineuses sont habituellement rompues chez l'aiguille âgée, mais peuvent occasionnellement persister, les plasmodesmes perforant la paroi secondaire. Les plastes sont peu nombreux et les thylacoïdes peu développés.

Entre temps (1970) PARAMESWARAN et LIESE, dans une note très brève, précisent quelques aspects infrastructuraux qui leur semblent caractéristiques des cellules de STRASBURGER de l'aiguille de P. silvestris. Pour eux, ces cellules ont une structure fine intermédiaire entre celle des éléments criblés et celle des cellules parenchymateuses de transfusion. Elles possèdent un gros noyau et un cytoplasme dense contenant de nombreuses petites vacuoles. Les mitochondries sont bien différenciées ; les ribosomes sont regroupés en polysomes ; le reticulum endoplasmique est le plus souvent granulaire ; les plastes contiennent des thylacoïdes aplatis et ne renferment jamais d'amidon. Il n'y a pas de protéine P et le plasmalemme est particulièrement visible.

C'est par le biais d'une étude cytochimique et cytoenzymatique effectuée en microscopie optique, sur la tige de Larix que SAUTER et BRAUN (1968 et 1972) ont fourni récemment les informations les plus intéressantes sur la signi-

fication et le rôle des cellules de STRASBURGER dans le tronc des Conifères. Pour ces auteurs, dans les rayons horizontaux, les cellules de STRASBURGER diffèrent des cellules dressées ou couchées par leurs communications avec les éléments criblés, leur absence d'amidon et leur activité phosphatasique extrêmement intense. Ces deux derniers caractères ne sont significatifs qu'à un stade déterminé de leur développement, caractérisant les cellules de STRASBURGER les plus actives. Les cellules de STRASBURGER fonctionnelles ont un cytoplasme moins dense que les cellules jeunes. Elles meurent en même temps que cesse l'activité de l'élément criblé avec lequel elles sont en relation. Certaines cellules du système vertical présentent des caractéristiques comparables. La teneur en protéines et en acides ribonucléiques des cellules de STRASBURGER fonctionnelles est plus faible que celle des cellules en cours de développement (249).

Les premiers, SAUTER et BRAUN contestent l'appellation "cellule albumineuse", pour eux dépourvue de signification. Ils constatent ultérieurement (250) que diverses activités enzymatiques liées à la chaîne respiratoire et l'activité phosphatasique, ne sont intensément développées que dans les cellules en relation avec les éléments criblés les plus fonctionnels. Pour eux ces enzymes interviennent dans l'attraction des métabolites élaborés dans les diverses parties de l'appareil végétatif, et leur transformation, d'autre part dans la fourniture d'énergie aux éléments criblés, énergie nécessaire à la conduction longitudinale. Nous-même dans une étude récente, qui vient d'être publiée (48), avons également contesté cette appellation de cellules albumineuses, en nous basant sur les caractères ultrastructuraux de ce tissu.

On voit donc qu'à l'heure actuelle, seules des études très fragmentaires ont été publiées sur les cellules de STRASBURGER de l'aiguille. Ayant été amené fortuitement, à l'occasion d'une expérimentation sur la localisation intracellulaire des lipides dans les aiguilles du Pin maritime, à "redécouvrir" l'ensemble cellulaire décrit pour la première fois par STRASBURGER, nous avons constaté l'absence de tout travail détaillé concernant ces cellules. C'est pourquoi nous avons pensé qu'il serait très intéressant d'entreprendre leur étude ontogénique et infrastructurale.

Après avoir précisé les conditions de prélèvement et la méthodologie utilisée nous ferons le bilan de nos observations en microscopie optique sur la morphologie et la répartition des cellules de STRASBURGER et en microscopie électronique sur leurs caractéristiques cytologiques. Quelques uns des caractères cytochimiques et enzymologiques du cytoplasme, des noyaux et des parois seront ensuite analysés. L'apparition et le mode de développement de cet ensemble cellulaire feront l'objet d'un troisième point. Enfin, pour effectuer une approche du rôle joué par les cellules de STRASBURGER dans la translocation des métabolites, nous évoquerons les résultats obtenus après l'incorporation de $^{14}CO_2$ dans les aiguilles et l'étude autoradiographique de la migration latérale des produits élaborés dans le chlorenchyme.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

# CHAPITRE I - MATERIEL et METHODES

## 1.1.- MODALITES DE PRELEVEMENT.

Le matériel végétal a été prélevé sur un lot homogène d'arbres d'environ 25 ans plantés en zone semi-urbaine. Aussitôt après le prélèvement, les aiguilles sont débitées en petits fragments, les bourgeons et les tiges fendus en tranches minces et placés, au laboratoire, dans le fixateur. La pénétration du mélange fixateur dans les tissus est facilitée en plaçant pendant quelques instants sous vide peu poussé jusqu'à ce que les objets "plongent", ce qui correspond à l'élimination de la plus grande partie des gaz intercellulaires s'opposant à la pénétration du liquide.

Il est essentiel que la dissection initiale soit assez poussée pour permettre l'accès rapide du fixateur à toutes les parties de l'objet.

## 1.2.- TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.

Pour l'étude anatomique et histologique du tissu de transfert les morceaux d'organes ont été fixés au mélange de NAWASCHIN ou au fixateur de SANFELICE (21,97) qui constitue une variante du précédent. Ces techniques conservent très mal le cytoplasme et ses organites mais assurent une bonne préservation du noyau et des parois, ceux-ci se prêtent ensuite à des colorations très diverses.

Après lavage soigneux à l'eau courante, les objets sont déshydratés très progressivement par une série éthanol/butanol primaire puis, après un séjour assez prolongé dans le butanol pur (24 h), infiltrés par des bains successifs de paraffine. Etant donné la dureté et l'hétérogénéité du matériel, le mélange final d'inclusion doit être dur et il est bon que la paraffine utilisée soit additionnée de "durcissants" divers (cire d'abeilles, acide stéarique, cérésine (188). La qualité du milieu d'inclusion conditionne étroitement la qualité des coupes obtenues, qui sont souvent difficiles à réaliser.

Nous avons expérimenté pour l'étude histologique divers autres mélanges fixateurs à base de bichlorure de mercure (Zenker et ses dérivés : Helly, Maximow), et d'acide trichloracétique (Halmi). Pour le travail histologique courant aucun ne présente d'avantage particulier sur les "CRAF" (trioxyde de chrome/acide acétique/formaldéhyde) habituellement utilisés par les auteurs anglo-saxons.

Les coupes ont été le plus souvent effectuées à 7-8 µ d'épaisseur et montées sur lames après étalement à l'eau gélatinée (additionnée de 1°/000 de thiomersal).

Le choix d'une technique de coloration a été fonction des tissus que nous voulions mettre en évidence, en l'occurence le phloème et les tissus qui s'y rattachent. Nous avons essayé les méthodes habituelles : safranine/vert lumière, bleu d'aniline/orange G, hématoxyline... Diverses colorations combinées ont été également proposées, par exemple celle combinant le chlorazol black E au mélange de Pianèse (vert malachite/fuchsine acide/jaune de Martius) (287) ou celles mettant en évidence la callose par le bleu de résorcinol (62). Toutes ces techniques ont des avantages mais ont en commun le défaut de n'avoir aucune signification cytochimique et de nécessiter, le plus souvent, une différenciation soigneuse. MAÅCZ et VAGAS (182) ont proposé une technique de coloration des tissus végétaux qui fait intervenir le bleu astra, associé à d'autres colorants

(auramine, rouge de cyanine) dont la spécificité est plus douteuse. Le mécanisme de cette coloration a été précisé par RICHTER (222), puis BENES (28). Le bleu astra est un colorant basique de haut poids moléculaire, de la série des triarylméthanes ; il est voisin du bleu alcian, qui est une phtalocyanine cuprique, couramment utilisé pour mettre en évidence les mucopolyosides acides des tissus animaux. Ces deux produits colorent avec électivité les pectines pariétales en raison de leur affinité pour les groupements carboxyles des acides glucuroniques ; la coloration est rapide, nette, ne nécessite aucune différenciation et fournit un contraste favorable en microphotographie.

Cette méthode qui est spécifique et a une signification histochimique nous a semblé préférable aux mélanges habituels qui mettent en balance les affinités réciproques et relatives des divers tissus pour des colorants, le plus souvent acides.

Après déparaffinage des lames, la coloration est réalisée de la façon suivante :

1 - les lames amenées à l'eau sont placées cinq minutes dans l'acide acétique en solution aqueuse à 5 % (pH 2.5) ;

2 - coloration 15 minutes à 24 h dans une solution à 1 % de bleu astra Merck dans l'acide acétique à 5 %. Le pH de la solution influe directement (28) sur la spécificité et l'intensité de la coloration ;

3 - après rinçage à l'acide acétique à 1 %, les lames sont lavées à l'eau courante et déshydratées ou bien subissent une coloration complémentaire

- soit à l'auramine en solution aqueuse à 1 % (coloration 10 secondes)

- soit par le rouge de cyanine (ou astrazone red FG) en solution aqueuse à 1 % (coloration une heure).

4 - finalement les lames sont déshydratées, éclaircies au xylène et montées au Technicon.

Après usage du bleu astra seul, les parois contenant des composés pectiques sont colorées en bleu et l'intensité de la coloration est proportionnelle à leur teneur en acides pectiques. L'auramine, dans les tons jaunes, ou le rouge de cyanine fournissent des colorations satisfaisantes des parois lignifiées ou subérifiées, des fibres de sclérenchyme, et de la cuticule. Cette technique présente l'avantage de colorer intensément le tissu de transfert, quel que soit son stade évolutif,ou le phloème jeune dont la paroi épaisse contient une proportion appréciable de pectines.

Nous avons prélevé des bourgeons en période hivernale, puis dès que les aiguilles ont atteint une certaine longueur, elles ont été fixées individuellement, d'abord in toto, puis ultérieurement à 3 niveaux : sommet-milieu-base. Le tableau I rend compte de l'ensemble des fixations effectuées. Aux fins d'étude anatomique, nous avons également fixé la base de l'aiguille et le brachyblaste qui lui fait suite, ainsi que des fragments de rameau (coupes radiales), de cotylédons d'âge varié et d'euphylles.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1969 | aiguilles 1969 | 24.4.69 | (1) | 1970 | aiguilles 1969 | 5.1.70 | 1971 | 23.12.71 (2) |
| | | 6.5.69 | (1) | | | 4.2.70 | 1972 | 20.1.72 (2) |
| | | 21.5.69 | | | | 7.3.70 | | 8.3.72 (3) |
| | | 4.6.69 | | | | 7.4.70 | | 17.3.72 (3) |
| | | 19.6.69 | | | | 4.5.70 | | 23.3.72 (3) |
| | | 30.6.69 | | | | 1.6.70 | | 2.4.72 (3) |
| | | 8.7.69 | | | aiguilles 1970 | 7.4.70 (2) | | 7.4.72 (3) |
| | | 23.7.69 | | | | 13.4.70 (2) | | 13.4.72 (3) |
| | | 10.9.69 | | | | 20.4.70 (2) | | |
| | | 1.10.69 | | | | 27.4.70 (1 + 2) | | |
| | | 3.11.69 | | | | 4.5.70 (1 + 2) | | |
| | | 3.12.69 | | | | 1.6.70 | | |
| | | | | | | 9.6.70 | | |
| | | | | | | 15.6.70 | | |

(1) ébauche entière

(2) bourgeon

(3) extrémité de bourgeons

TABLEAU I - Dates auxquelles ont été effectués les prélèvements destinés à l'étude histologique et ontogénique des aiguilles.

## 1.3.- TECHNIQUES CYTOLOGIQUES.

### 1.3.1. Microscopie optique

Dans un premier temps de notre travail nous avons assez longuement expérimenté pour déterminer le mélange fixateur assurant, sur notre matériel, la meilleure préservation du cytoplasme et des organites sur coupes à la paraffine.

Toute une gamme de fixateurs a été utilisée et la plupart assurent une préservation convenable des plastes et des mitochondries. Il en est ainsi des mélanges suivants : fixateur de REGAUD, fixateur de KOLSTER (97), fixateur "ERLIKI" dérivé des travaux de ZIRKLE (296 à 299), dans sa formule originale ou celle d'ERICKSON & ROSEN (75), fixateur de CHAMPY, et enfin fixateurs issus de la formule initiale de ZENKER (HELLY, MAXIMOV).

De l'ensemble des observations réalisées sur des préparations fixées par des mélanges variés, il ressort que les fixateurs contenant du trioxyde de chrome et, naturellement, de l'acide acétique ne permettent pas une préservation qualitative et quantitative satisfaisante du cytoplasme fondamental. A cet égard les mélanges à base de bichlorure de mercure et de formaldéhyde donnent de meilleurs résultats. Ceux-ci sont améliorés par l'addition à la solution fixatrice d'une petite quantité de tétroxyde d'osmium. Dans la gamme des fixateurs "classiques", c'est le Maximow/OsO4 (21) qui fournit les meilleurs résultats : les organites sont bien préservés, faciles à colorer ; la rétraction cytoplasmique est faible et les pertes en ARN paraissent réduites. L'étude au microscope électronique de cellules fixées par les méthodes conventionnelles utilisée en cytologie/paraffine (22) a montré que la préservation ultrastructurale est extrêmement médiocre. Il en ressort cependant (23) que le formaldéhyde utilisé seul peut avantageusement être remplacé, par du glutaraldéhyde, et il est probable qu'il en est de même pour toutes les combinaisons conventionnelles dans lesquelles il est utilisé.

Le principe même d'une préfixation des tissus au glutaraldéhyde nous est apparu indispensable, en raison même de la qualité des images obtenues en microscopie électronique et de la solidité des liaisons contractées par cet aldéhyde avec les protéines cellulaires. Utilisé seul cependant, le glutaraldéhyde fournit des images "plates", incomplètes, peu chromophiles.

La préfixation au glutaraldéhyde suivie d'un mordançage à l'acétate mercurique, technique dérivée de celle utilisée par GOUGH et FULTON avec le formaldéhyde (97), ne fournit pas de résultats satisfaisants. La coagulation du cytoplasme est assez grossière et les images obtenues manquent de clarté.

La postfixation au tétroxyde d'osmium telle qu'elle est utilisée en microscopie électronique ne fournit pas en microscopie optique de résultats satisfaisants : le cytoplasme est légèrement contracté, les organites sont difficiles à colorer et manquent de relief. Après plusieurs essais, il est apparu que les meilleurs images cytologiques sont obtenues en faisant suivre la préfixation au glutaraldéhyde par un traitement au liquide d'ALTMANN (tétroxyde d'osmium/bichromate de potassium). La préservation des organites est excellente, le cytoplasme est parfaitement bien conservé même dans ses plus fins détails, les coupes peuvent facilement être colorées à l'hématoxyline.

La technique retenue finalement est la suivante :

Les objets subissent une préfixation au glutaraldéhyde ; la concentration en aldéhyde, la durée de la fixation et la nature du tampon sont les mêmes que celles choisies pour la microscopie électronique, en l'occurrence solution à 4,25 % dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7.2 additionné de 5 % de

saccharose, 2 h à 4°C. Après rinçage soigneux au tampon, les fragments d'aiguille sont placés pendant 12 h à 24 h dans le mélange d'Altmann à température ambiante. Après lavage à l'eau courante, on déshydrate et inclut de la façon habituelle. Les objets se coupent assez difficilement en raison du traitement osmique, qui les rend durs et cassants.

Les coupes à 3-4 µ sont colorées à l'hématoxyline ferrique. La solution d'hématéine est préparée à partir d'une solution d'hématoxyline à 1 % dont la maturation instantanée est assurée, au moment de l'emploi, par addition d'une petite quantité d'iodate de sodium, selon BAKER et JORDAN (21). Dans ces conditions, la moitié environ de l'hématoxyline est transformée en hématéine (davantage si l'hématoxyline initiale en contenait une quantité appréciable) et la solution se conserve longtemps. L'hématoxyline non transformée s'oxyde lentement et il faut un certain temps avant d'aboutir à une suroxydation. Les produits de suroxydation de l'hématéine provoquent des colorations non spécifiques et, à ce moment-là la solution d'hématéine doit être écartée. La laque ferrique d'hématoxyline est différenciée, classiquement, à l'alun. Les images obtenues sont claires et précises. La différence par rapport aux mélanges habituels est surtout sensible en ce qui concerne le cytoplasme dont l'intégrité est bien préservée (trabécules). (Pl.26, g et h).

D'autres aldéhydes ont été proposés. FEDER et O'BRIEN (88) utilisent l'acroléine seule, les objets sont inclus ensuite dans le méthacrylate. Les résultats sont très bons. En préfixation avant le mélange d'Altman cependant, l'acroléine et la méthacroléine que nous avons utilisés fournissent des résultats inférieurs au glutaraldéhyde.

Nous avons pendant une année procédé à la fixation de morceaux d'aiguilles selon la méthode ci-dessus afin d'effectuer une étude cytologique selon les procédés habituels. Cette mise au point a perdu cependant une grande partie de son intérêt lorsque nous avons eu accès à la microscopie électronique et nous n'avons pas procédé à une étude détaillée des résultats ainsi obtenus en microscopie optique.

Les microphotographies au microscope optique ont été réalisées à partir de coupes semi fines, colorées au violet de gentiane ou de coupes à la paraffine colorées selon la technique au bleu astra exposée ci-dessus. Les images sont enregistrées sur film copex orthochromatique, après accentuation du contraste, pour les coupes semi-fines, à l'aide d'un filtre interférentiel vert jaune à bande moyenne (transmission maximale à 540 nm). Les colorations au bleu astra ne nécessitent pas de filtre à la prise de vue. Les photographies en couleur constituent des tirages sur papier d'émulsion inversibles Ektachrome HS lumière du jour pour la fluorescence ou KodachromeIIA. Dans ce dernier cas, on obtient une température de couleur adéquate (3400° K) avec une lampe quartz-iode au voltage nominal (12 V).

### 1.3.2.- Microscopie électronique

Nous avons procédé d'emblée à des doubles fixations glutaraldéhyde/osmium. L'osmolarité de la solution fixatrice doit être soigneusement ajustée à la tonicité des cellules de STRASBURGER qui est très élevée. La qualité du tampon n'est pas non plus indifférente. Les tampons acétate/véronal et cacodylate ont fourni des résultats très inférieurs au tampon phosphate. Des essais systématiques ont montré que l'on obtient les meilleurs résultats avec une solution de glutaraldéhyde à 4,25 % dans du tampon phosphate (phosphate monopotassique/phosphate disodique) ajusté à pH 7,2, additionné de 5 % de saccharose ; l' osmolarité est de 830 milliosmoles environ. Cette valeur élevée est à rapprocher de celle (1000 milliosmoles) du mélange optimal sélectionné par KIDWAI et ROBARDS (160) pour la fixation du cambium de Salix. Il faut rappeler à ce sujet les difficultés rencontrées antérieurement par différents auteurs pour obtenir des fixations correctes des cellules albumineuses de la tige des Conifères. Nous avons obtenu des résultats très comparables avec des glutaraldéhydes de provenances diverses : glutaral-

déhyde technique d'Eastman Kodak à 25 %, glutaraldéhyde à 50 % purifiée de Fisher, glutaraldéhyde Merck à 25 %. Nous avons également procédé à divers essais de purification de glutaraldéhydes commerciaux, en réalisant en particulier une distillation fractionnée sur colonne de Vigreux (7). La tête et la queue du distillat sont éliminés, le glutaraldéhyde est dilué à 50 % avec de l'eau bi-distillée et conservé en atmosphère d'azote sur une résine faiblement cationique (Amberlite IR.45). On sait en effet (137, 138) que les produits d'oxydation (acide glutarique) sont responsables d'un abaissement progressif du pH des solutions de glutaraldéhyde. Pour divers auteurs, les solutions de glutaraldéhyde ne devraient pas être utilisées si leur pH est inférieur à 3,5. En fait, les solutions commerciales ont fréquemment un pH de 2,5. Le glutaraldéhyde fraichement distillé a un pH de 4,2. Il est juste de dire cependant que les divers raffinements préconisés pour la purification du préfixateur ne trouvent pas leur justification dans les résultats observés. Nous avons obtenu des fixations très comparables avec les divers glutaraldéhydes utilisés. Le rôle joué dans la fixation par les diverses impuretés contenues dans la solution de glutaraldéhyde est en fait très mal connu (231).

Les tranches minces d'objet, fixées à 4° C, sont dégazées comme ci-dessus, et lavées au tampon pendant 3 h à 4° C. On postfixe ensuite dans une solution à 1 % de tétroxyde d'osmium dans du tampon phosphate pH 7,2 pendant une heure à 4° C. Après rinçage, la déshydratation est réalisée à l'aide d'une série éthanolique très progressive. Avant d'être inclus dans la résine, les objets transitent par l'oxyde de propylène et un mélange oxyde de propylène/résine. Ces dernières étapes ne doivent pas être négligées car l'aiguille constitue un matérel difficile à inclure. La résine finale d'inclusion est constituée par un mélange d'epon 812, de DDSA et de MNA ; l'accélérateur est du DMP 30. Les objets inclus en gélules polymérisent 48 h au moins à l'étuve à 60°. Les coupes ont été réalisées sur un ultramicrotome Reichert et montées sur des grilles 200 ou 300 mesh en cuivre ou, éventuellement, en or. Elles sont ensuite contrastées à l'acétate d'uranyle (5 minutes sur une solution concentrée dans l'éthanol à 50°), puis au citrate de plomb (3 minutes en présence de soude). Nous avons observé les coupes fines au Centre de Microscopie Electronique de l'Université de Bordeaux I, sur microscope OPL EMU 2.

## 1.4. METHODES D'ETUDE DE LA PAROI CELLULAIRE

### 1.4.1. Observations en microscopie optique

Diverses techniques de coloration peuvent fournir, à l'échelon histologique, des indications sur la composition des parois cellulaires et la localisation, en leur sein, de leurs divers constituants polysaccharidiques. La réaction à l'acide périodique/Schiff colore de façon intense, mais globale tous les glucides de constitution porteurs de groupements vic-glycols 1,2. Plusieurs colorants du groupe des thiazines ont été proposés (bleu de toluidine, azur A) pour

la coloration différentielle des parois sur coupes à la paraffine (213), coupes semi-fines incluses au méthacrylate (88) ou coupes de tissus frais (202). Les résultats varient quelque peu selon les modalités expérimentales mais il est possible, dans certaines conditions, d'attribuer une signification cytochimique aux colorations ortho ou métachromatiques obtenues. Nous avons utilisé du bleu de toluidine O en solution à 0,1 % dans du tampon acétate à pH4 (coloration 15 mn à 24 h). Le bleu astra (ou le bleu alcian 8 GX) en solution acétique à pH 2,5, et le rouge de ruthénium en solution aqueuse très diluée, permettent de caractériser les groupements acides des pectines. Pour mettre en évidence les pectines méthylées, on dispose en outre de la technique de REEVE (221), à l'hydroxylamine ferrique ; les zones de concentration des pectines estérifiées apparaissent en brun rougeâtre ; la coloration peut être intensifiée par méthylation préalable des coupes (méthanol bouillant + 0.5N HCl (150). Ces diverses réactions ont été pratiquées sur coupes de tissus frais ou sur coupes de tissus fixés selon les méthodes histologiques conventionnelles. On ne dispose pas, pour mettre en évidence les hemicelluloses et la cellulose des parois, de méthodes très sûres. Il semble cependant que le rouge Congo, utilisé en solution alcaline selon PUCHTLER, SWEAT et LEVINE (220) se fixe avec électivité sur les microfibrilles cellulosiques.

Les techniques d'ESCHRICH et CURRIER (1964) au bleu de résorcinol (fond clair) ou au bleu d'aniline (fluorescence) ont servi à mettre en évidence la callose sur des coupes de tissus frais ou fixés par l'éthanol/acide acétique (3 : 1) amené à -74°C par addition de glace sèche et coupés au cryostat. On peut également étudier l'autofluorescence des différents tissus en montant des coupes de tissus frais dans des solutions tampons de pH variés. Pour les observations en fluorescence, les préparations sont montées dans la solution de phosphate dipotassique M/15 ou dans un milieu permanent (gomme arabique-acétate de potassium) et observées en UV dans la bande 366 nm.

### 1.4.2. Observations en microscopie électronique

Les méthodes d'étude de la paroi cellulaire en microscopie électronique ont fait l'objet d'une revue récente (243), qui en a précisé la signification et les modalités expérimentales.

La réaction de l'APS utilisée en microscopie optique peut être transposée sur ultracoupes selon la méthode de THIERY (278) le contraste étant réalisé à l'aide de sels d'argent. Dans la pratique, les grilles en or ont subi un traitement par l'acide périodique (30 mn), la thiocarbohydrazide (18 à 24 h) et le protéinate d'argent (1 h). La validité de la méthode pour la mise en évidence des glucides pariétaux des cellules végétales a été démontrée à diverses reprises (234, 237, 239, 242).

Avec le bleu alcian et le rouge de ruthénium, nous avons essayé d'obtenir une augmentation du contraste électronique des pectines, selon les techniques proposées pour les mucopolysaccharides animaux au rouge de ruthénium (181)

et au bleu alcian (27, 240, 279). Avec le bleu alcian, divers essais ont été effectués, soit en associant le colorant au glutaraldéhyde, soit en colorant des tranches minces de matériel préfixé, avec ou sans postfixation osmique. Dans tous les cas, le colorant est utilisé en solution à 1 % dans du tampon acétate à pH 2,5 pendant 3 heures. Les coupes sont observées sans contraste additionnel ou après traitement à l'uranyle/plomb. Le rouge de ruthénium a été utilisé dans les conditions préconisées par ROUGIER (242).

La technique préconisée par REEVE (221) pour la mise en évidence des pectines en fond clair convient également en microscopie électronique (4, 5, 6). En effet, les hydroxamates ferriques formés sont denses aux électrons, et leur relative abondance est proportionnelle à la concentration en esters pectiques méthylés. On peut également (33, 155) effectuer la réaction sur coupes fines recueillies sur des grilles en or, en utilisant de préférence des solutions réactives plus diluées.

L'extraction chimique sélective des constituants de la paroi, initialement proposée par JENSEN (149) sur coupes à la paraffine, peut être réalisée sur blocs minces préfixés au glutaraldéhyde (151, 236). Les composés pectiques sont éliminés par un traitement de 1 h à 24 h par EDTA sel disodique 0,05 M aqueux à 25 ° C. La soude à 5 %, à 25°C, extrait en 1 h les hémicelluloses les plus accessibles ; l'extraction est complète en 24 h.

C'est ROLAND (236) qui a suggéré l'emploi en microscopie électronique d'enzymes appropriées pour dégager des parois les pectines, les hémicelluloses et la cellulose, et préciser ainsi leur agencement infrastructural. Nous avons utilisé des enzymes Sigma : pectinase purifiée d'origine fungique, hémicellulase extraite de Rhizopus, cellulase type I d'Aspergillus niger, à 0,5 % dans des solutions tamponnées à pH 7,2 ou au pH d'activité maximale des enzymes considérées (respectivement 4.0, 5,5 et 5.0). Des tranches minces d'objets préfixés sont mises à incuber à 25°C pendant 2 h, 6 h, 24 h et 72 h, puis lavées brièvement et postfixées comme de coutume.

## 1.5. TECHNIQUES D'ETUDE DES LIPIDES

### 1.5.1. Mise en évidence des lipides neutres

#### 1.5.1.1. Lysochromes et fluorochromes

La mise en évidence des lipides "neutres" (essentiellement triglycérides et stérides) ne présente pas de difficultés particulières si l'on se contente d'une appréciation globale de leur répartition dans les cellules et de la teneur respective des différents tissus (72). Les lipides neutres végétaux apparaissent le plus souvent sous forme de gouttelettes isotropes de taille très variable. On peut les caractériser à l'aide de colorants azoïques pour lesquels LISON a proposé le nom de "lysochromes". Il s'agit de pigments qui se dissolvent sélectivement dans la phase hydrophobe des cellules, en raison de leur affinité particulière pour les lipides par rapport au solvant qui les véhicule (coefficient de partage favorable aux lipides). Il n'y a donc pas véritablement coloration mais lipodissolution du colorant, sans formation de liaisons chimiques entre le colorant et le site coloré. Parmi les colorants existants, un certain nombre n'ont plus qu'un intérêt historique : le soudan III, par exemple, qui ne communique aux inclusions grasses qu'une teinte orangée peu favorable à l'observation microscopique. D'autres colorants rouges ont été proposés depuis : soudan IV, fat red 7 B, soudan 7 B (25). Ils colorent plus intensément les lipides, mais sont cependant inférieurs au soudan noir B, qui a été introduit par LISON (176).

Nous avons essayé tous ces colorants. En ce qui concerne l'intensité de la coloration et le contraste visuel obtenu, il n'est pas douteux que le soudan noir B fournit de très loin les résultats les plus favorables. Il colore en noir franc ou noir bleuté toutes les inclusions lipidiques et permet de mettre en évidence même les gouttelettes les plus petites. Les colorants de diverse provenance ne fournissent pas des résultats identiques quant à l'intensité de la coloration obtenue et à sa spécificité. On sait en effet que le soudan noir B constitue en réalité (30, 251, 252) un mélange de diverses fractions colorées. Seule la teneur en fraction colorante noire ou bleu noire influe sur la densité de la coloration. Le solvant utilisé pour la dissolution du colorant influe également sur la préservation des gouttelettes lipidiques et l'intensité de la coloration. On a abandonné depuis longtemps comme véhicule du colorant des solutions concentrées en acétone ou en éthanol qui, si elles assurent une excellente dissolution du colorant, entrainent la disparition des gouttelettes les plus fines. Le triéthylphosphate (108), l'éthylène glycol et le propylèneglycol (63) ont été proposés ; de notre point de vue ils ne sont pas supérieurs à l'éthanol à 60 % et surtout à l'alcool butylique tertiaire à 35 %. On constate cependant dans certaines conditions une coloration brunâtre, basique, de niveaux cellulaires (noyau) en principe non concernés par la coloration. Pour certains auteurs, la fraction basique est initialement produite lors de la préparation du colorant et peut être éliminée par acétylation. Le soudan noir B acétylé produit également dans certains cas des colorations non spécifiques. Il semble bien plutôt que le colorant ait tendance à se décomposer assez rapidement en solution ; cette décomposition est activée lorsque les coupes de tissus sont susceptibles de réagir avec le colorant, lorsque le fixateur n'a pas été entièrement éliminé par exemple. De toute façon, la spécificité du noir soudan B a été contestée (94, 134, 166, 251, 252, 277). Les expériences in vitro montrent qu'il peut dans certains cas colorer des fractions cellulaires totalement dépourvues de lipides. Quoiqu'il en soit, la plupart des échantillons de noir soudan B fournissent des colorations intenses, précises et le plus souvent spécifiques des gouttelettes lipidiques intracellulaires.

Un des points critiques de la coloration des lipides neutres est la dissolution partielle par le solvant du colorant des gouttelettes que l'on cherche à mettre en évidence. Certains ont cherché à obtenir des solutions aqueuses d'azoiques en ajoutant des substances hydrotropes (caféine) au milieu aqueux afin de faciliter la mise en suspension du colorant. Les colorations obtenues ainsi ne sont pas très intenses.

Les fluorochromes apportent une excellente réponse au problème de la conservation, dans son intégralité, de la fraction lipidique cellulaire. Cette technique a été initialement proposée par STRUGGER (271).

Utilisés en solution aqueuse, ils respectent parfaitement l'intégrité des inclusions grasses les plus fines qui peuvent être mises en évidence avec un fort effet de contraste au microscope à fluorescence. FERRANS (89) a fait le point sur cette question et il semble que ces conclusions, qui découlent de l'observation de tissus animaux, peuvent être reprises pour les cellules végétales. La phosphine 3 R (282) et la thioflavine T (en solution acétique) constituent les meilleurs fluorochromes. La rhodamine a été proposée il y a longtemps par STRUGGER (271). Le cas du 3 : 4 benzopyrène est un peu différent. Il s'agit d'un hydrocarbure (le chrysène et l'anthracène ont également été proposés) (180) non hydrosoluble. On peut cependant en obtenir des solutions aqueuses très diluées, soit en partant d'une solution acétonique, soit en dispersant le produit dans une solution concentrée de caféïne (29). L'électivité et l'intensité des fluorochromisations produites par le 3 : 4 benzopyrène sont très grandes. On observe les coupes après rinçage en milieu aqueux,

dans le proche ultraviolet. Toutes les gouttelettes lipidiques présentent une fluorescence blanc brillant ou jaune orangé . Cette technique a l'avantage de ne mettre en oeuvre aucun solvant apolaire.

Préparation des tissus préalable à l'usage des fluorochromes et des lysochromes

L'observation de coupes de tissus frais ne constitue qu'un pis-aller. Les cellules végétales fortement hydratées, mises au contact de solutions éthanoliques, subissent une certaine désorganisation protoplasmique et une partie des gouttelettes lipidiques est perdue ; il est probable également que les lipides de constitution engagés dans des complexes lipoprotéiques subissent un démasquage partiel (135, 255). Des faits du même ordre ont été observés dans des coupes de tissus animaux (273-274). Il est préférable d'effectuer une préfixation du matériel au formaldéhyde ou à l'aide d'un autre aldéhyde. Le formaldéhyde a l'avantage de contracter des liaisons très solides avec les polyphénols intravacuolaires et donc de conserver le contenu du vacuome chaque fois qu'il renferme des tanins.

1.5.1.2. Coloration nadi différentielle.

Les lipides végétaux contiennent le plus souvent une quantité notable d'acides gras insaturés (187). On peut utiliser cette caractéristique en mettant en évidence les péroxydes produits par les doubles liaisons éthyléniques en présence de l'oxygène atmosphérique. C'est sur ce principe que repose la réaction nadi introduite par ZWEIBAUM et MANGENOT (301), et la réaction à l'hémine proposée par DAM et GRANADOS (69, 105). Nous avons repris sur notre matériel la réaction nadi (71). En présence d'un mélange équimoléculaire d'α-naphtol et de chlorydrate de diméthylparaphénylènediamine, les lipides insaturés prennent une coloration rose lilas dûe à la formation d'un complexe coloré entre le bleu d'indophénol naissant issu du mélange, en présence d'oxygène, et les péroxydes lipidiques. Dans les mêmes conditions, les gouttelettes dépourvues de doubles liaisons, ou les inclusions non lipidiques (terpènes) se colorent en bleu noir, par un mécanisme simple de dissolution du bleu d'indophénol, comparable aux colorations obtenues avec les lysochromes. Les modalités d'emploi de la réaction sont les mêmes que celles servant à la mise en évidence de la cytochrome oxydase (248) mais, pour éviter une interférence enzymatique, il est bon de préfixer brièvement les tissus au glutaraldéhyde ; l'activité enzymatique, très labile, est ainsi supprimée. On monte les coupes en milieu hydrosoluble (glycérine, sirop d'Apathy, sirop de lévulose). Les colorations pâlissent au bout de 12 h et disparaissent totalement en 3 jours.

1.5.1.3. Mise en évidence des lipides sur coupes minces sériées

Il n'est pas possible avec les techniques courantes (coupes à main levée ou, mieux, cryostat), d'obtenir des coupes minces, sériées, de tissus dans lesquels les lipides sont convenablement préservés. Aussi nous avons envisagé d'utiliser sur les tissus végétaux des polyéthylèneglycols comme milieux d'inclusion pour la réalisation de coupes fines, selon une méthode mise au point sur des tissus animaux (223, 241, 300).

Les polyéthylèneglycols (carbowaxes) sont des polymères à longue chaîne de poids moléculaire varié. Les polymères les plus simples sont liquides, les plus complexes sont solides à température ambiante, les composés intermédiaires (PG 600 à 1000) ayant une consistance plus ou moins pâteuse. Ces composés sont entièrement solubles dans l'eau, aussi ont-ils été proposés par divers auteurs comme milieux d'inclusion destinés à l'étude des lipides après fixation au formol calcium car l'infiltration se déroule en milieu aqueux. Il semble que l'on puisse obtenir des résultats satisfaisants sur des tissus ani-

maux riches en lipides saturés à point de fusion élevé. Appliquée à notre matériel, la méthode fournit au contraire des résultats décevants, car la majeure partie des inclusions lipidiques intracellulaires disparaît lors de l'inclusion par les polyéthylèneglycols à chaud, pour des raisons surtout mécaniques. L'élévation de température entraîne en effet une fluidification des lipides qui sont seulement stabilisés, mais non pas "fixés" au sens cytochimique du terme, par une fixation brève au formol- calcium. Dans ces conditions, lors de l'infiltration, les lipides sont déplacés par les polyéthylèneglycols, dont la viscosité est au contraire extrêmement élevée aux températures voisines de leur point de fusion (150 à 400 c.s.t.)

Cependant la conservation intégrale des lipides peut être réalisée efficacement par l'acide osmique (285), et nous avons suggéré une technique dans laquelle la fixation des tissus et des lipides est assurée simultanément par un mélange de formaldéhyde et de tétroxyde d'osmium (formol-calcium de Baker à 0,5 % d'$OsO_4$ (47). Ce fixateur apparemment irrationnel s'est révélé suffisamment stable dans les conditions d'utilisation.

Divers polyéthylèneglycols cireux (P.G. 1000, 1540, 4000) purs ou en mélanges ont été essayés comme milieux d'inclusions. Nous avons aussi utilisé l'"oxydwachs" (constitué par un mélange de polyéthylèneglycols et d'oxydes de polyéthylène) qui se présente sous deux formes : "oxydwachs A" (Pf 42° C) et "oxydwachs AN" (Pf 60° C). Ces deux composés, proposés par HALLE (119) ne sont pas hygroscopiques, ce qui rend leur conservation et leur manipulation plus aisée. Les deux mélanges suivants conviennent à la réalisation de rubans de coupes de 7 u, à 20°C : a. PG 1000-PG 1540 (15-85) ; b. "Oxydwachs A- oxydwachs AN" (1-2).

Sur les coupes, les lipides des tissus peuvent être caractérisés, soit après blanchiment au peroxyde d'hydrogène et coloration par un lysochrome, soit par action directe d'un mélange polyphénolique (mélange de Kolossow), qui révèle l'osmium combiné avec les lipides. Cette deuxième méthode fournit des résultats nets et beaucoup plus sûrs. Un traitement préalable des blocs par le gallate d'éthyle ne présente pas d'avantage pour la coloration des lipides. Les localisations fournies par cette méthode ont été soigneusement comparées à celles obtenues sur des coupes à congélation de tissus fixés au formol-calcium et colorés au noir soudan B en solution dans l'alcool à 60°.

A la suite de ces divers essais nous avons finalement adopté la méthode suivante.

Les pièces de petite taille (1 à 2 mm), sont fixées au formol-osmium-calcium pendant 8 h (à l'obscurité). Après lavage d'une heure à l'eau courante, elles sont simultanément déshydratées et infiltrées dans des bains de concentration croissante (30 %, 50 %, 75 %, 95 %, 100 %) de polyéthylèneglycol 1540, d'une heure chacun ; puis par deux bains de 2 h d'un mélange C 1540-C 1000 (85-15). Le mélange "oxydwachs A-oxydwachs AN" s'utilise dans les mêmes conditions que les polyéthylèneglycols.

Après montage des blocs sur des supports en bois, sur lesquels les blocs adhèrent mieux, les coupes sont faites au microtome rotatif, à paraffine, l'angle de libération devant être ajusté à une valeur inférieure à celle habituellement utilisée pour les coupes à la paraffine, en modifiant l'angle du rasoir de 5° environ.

La technique employée pour le montage des rubans de coupes dérive de celle de HALLE (119). Les lames sont enduites d'un adhésif gélatine-diéthylèneglycol-eau (3-20-20 en poids), préalablement chauffé à 50°C et étalé en couche mince. Après refroidissement, on verse sur la lame quelques gouttes de diéthylèneglycol pur que l'on étale également en couche mince. Les rubans s'étendent aussitôt, sans distorsion, et les coupes adhèrent à la gélatine.

Pour éliminer l'excès de liquide, les lames sont placées à la verticale puis essorées sur les bords avec du papier filtre. Il faut les conserver à la température ordinaire et surtout éviter qu'elles ne se déssèchent ; elles doivent donc être utilisées dans les 48 h. Après fixation au formol-calcium-osmium, il faut légèrement blanchir les coupes dans du peroxyde d'hydrogène à 1 %, pour éliminer les colorations non lipidiques. Puis après un bref passage à l'eau distillée, on plonge directement les lames dans le liquide de Kolossow où on les laisse pendant 48 h. La gélatine est instantanément "tannée" ce qui assure une parfaite adhésion des coupes.

Au sortir du bain réducteur, les lames sont seulement égouttées. On monte alors sans rincer, au sirop de lévulose. Les inclusions lipidiques sont colorées en noir intense. Toutes les autres structures cellulaires sont incolores ou légèrement grisâtres. La méthode paraît précise et spécifique.

Bien que des méthodes du même ordre aient été préconisées, associées aux techniques histologiques classiques, inclusion à la paraffine en particulier (244), il ne semble pas que l'on puisse en attendre des résultats aussi rigoureux. En effet, quel que soit le mode de fixation et de déshydratation utilisés, une part non négligeable des lipides cellulaires disparaît au cours des traitements précédant l'inclusion, inconvénient que ne présente pas la méthode que nous avons mise au point.

1.5.2. Mise en évidence des phospholipides

Cette méthode convient également à la mise en évidence des phospholipides sur coupes fines sériées, après traitement des blocs selon la technique originale de BAKER (18) ou ses variantes plus simples (139). Elle permet également d'obtenir des coupes minces et sériées en évitant l'inclusion à la paraffine utilisée par d'autres auteurs. La conservation des phospholipides est excellente, et comparable à celle obtenue sur coupes à congélation. Les morceaux d'aiguilles, après fixation au formol calcium, subissent une postchromisation au bichromate-calcium ; après inclusion dans le carbowax 1540, les coupes sont colorées à l'hématéine acide puis différenciées au borax-ferricyanure. Les sites riches en phospholipides sont mis en évidence par la formation d'une laque chromique d'hématoxyline de couleur bleue. Afin d'éliminer les causes d'erreurs provenant de la coloration non sélective des nucléoprotéines, on traite par la même technique des blocs témoins fixés au Bouin et extraits à la pyridine, ce qui a pour effet d'éliminer la totalité des lipides cellulaires.

1.6.- TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES CELLULAIRES

Pour mettre en évidence les protéines intracellulaires, on fait le plus souvent appel à quelques techniques simples, dont la spécificité n'est pas toujours rigoureuse. Par exemple, la technique au bleu de bromophénol proposée par MAZIA et coll. est largement utilisée (20) et pourtant LISON a montré qu'elle n'avait pas de signification cytochimique, ce composé se comportant comme un colorant basique banal.

| Technique mise en oeuvre | FIXATEURS UTILISES | | | | | | Résultat | Radicaux mis en évidence |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Formol/Ca 6 h | Formol /Ca 24 h | Carnoy 6 h | Carnoy 24 h | Gluta 24 h | Maximow/ Gluta 24 h | | |
| FAST GREEN FCF | + | | | | | | + | Protéines basiques (histones) |
| JAUNE NAPHTOL S | + | | | | | | + | "Acidophilie totale" |
| NINHYDRINE/SCHIFF | + | + | | + | + | + | - | |
| ALLOXANNE/SCHIFF | + | + | | + | + | + | - | |
| CHLORAMINE T/SCHIFF | | + | | + | + | + | - | |
| TETRAZOREACTION | | + | | + | + | | + | amine |
| DINITROFLUOROBENZENE | | + | | + | + | + | + | amine |
| DNFB/$TiCl_3$ | | + | | + | + | + | + | amine |
| 2 - HYDROXY 3-NAPHTALDEHYDE | | | | + | + | + | + | amine |
| HYDRAZIDE HYDROXY NAPHTOIQUE | | + | | + | + | + | - | |
| TANIN OXYDE/AZO | | + | | + | + | + | + | amine |
| DIAZOREACTION/ACIDE S | + | + | + | + | + | + | + | phénol (Tyrosine) |
| DIAZOREACTION/ NAPHTORESORCINOL | | | | | | | + | phénol (Tyrosine) |
| | | | | | | | - | |
| SAKAGUCHI/8-HYDROXYQUINOLEINE | + | + | + | + | + | | + | guanidyl (Arginine) |
| DIMETHYLAMINOBENZALDEHYDE/ACIDE S | + | | | | + | | + | indol (Tryptophane) |
| ROSINDOLE | + | | | | + | + | + | indol (Tryptophane) |

Tableau 2 - Techniques histochimiques utilisées pour caractériser les différents groupements réactifs liés aux protéines cellulaires

Assez peu d'auteurs ont expérimenté sur du matériel végétal les techniques mises au point au cours des vingt dernières années sur des tissus animaux et destinées à mettre en évidence la totalité des protéines cellulaires d'une part, le groupement amine d'autre part, enfin divers groupements latéraux portés par les acides aminés constitutifs.

L'ensemble de l'expérimentation réalisée est rapporté plus en détail dans le tableau 2. Les techniques suivantes nous ont fourni des résultats positifs et intéressants :

1 - méthodes au Fast Green FCF d'ALFERT et GESCHWIND et au Jaune Naphtol S de DEITCH, destinées à la coloration globale de protéines basiques (histones) : estimation de l'"acidophilie totale".

2 - méthodes mettant en évidence le groupe $\alpha$-aminé commun à tous les acides aminés et, éventuellement, d'autres groupements réactifs ;

- tétrazoréaction à l'acide H
- réaction au dinitrofluorobenzène
  - . variante de ZERLOTTI et ENGEL
  - . variante de TRANZER et PEARSE (au trichlorure de titane)
- réaction à l'hydroxy-3-naphtaldéhyde -2 (WEISS, TSOU et SELIGMAN)

Les contrôles sont obtenus en pratiquant les réactions après désamination à l'acide nitreux (STOWARD).

3 - méthodes permettant de caractériser certains groupements spécifiques

- phénol (tyrosine)
  - . diazoréaction à l'acide S (GLENNER et LILLIE)
  - . diazoréaction au naphtorésorcinol/sulfate de cuivre (GLENNER et LILLIE)
- guanidyle (arginine) : réaction de SAKAGUCHI à l'hydroxy-8 quinoléïne selon CARVER, BROWN et THOMAS
- indole (tryptophane)
  - . réaction à la diméthylaminobenzaldéhyde de LISON et PINHEIRO
  - . réaction à la diméthylaminobenzaldéhyde/diazo d'acide S selon GLENNER et LILLIE
  - . réaction "du rosindole" de GLENNER

Les modalités expérimentales de ces réactions sont rapportées en détail dans les traités habituels (54, 97, 100, 108, 177, 213).

Fixation des tissus en vue de l'étude cytochimique des protéines

Le prétraitement des tissus, avant coloration des coupes, peut avoir une influence décisive sur la conservation et l'accessibilité des divers groupements réactifs liés aux protéines (amine, phénol, sulphydryle...). Il n'y a pas de technique de fixation standard donnant les meilleurs résultats dans tous les cas. Aussi, pour toutes les méthodes envisagées, avons-nous traité systématiquement plusieurs jeux de lames issus de blocs fixés de manières différentes, et en particulier : formol-calcium 6 h, formol-calcium 24 h, glutaraldéhyde 24 h, fixateur de Maximow/glutaraldéhyde 24 h, Carnoy 6 h, Carnoy 24 h.

## 1.7. MISE EN EVIDENCE DE DEUX ACTIVITES ENZYMATIQUES

### 1.7.1. activité glucose.6.phosphatasique

La glucose 6 phosphatase est une enzyme très labile rapidement détruite par les préfixations aldéhydiques utilisées en microscopie électronique (147). La conservation de l'enzyme se réalise aux dépens de la qualité de la fixation et là encore il faut réaliser un compromis pour pouvoir localiser correctement les sites d'activité de l'enzyme.

Il était donc intéressant de comparer les résultats obtenus avec divers types de préfixations. Parmi les divers aldéhydes proposés par SABATINI et al. (245-246) nous avons utilisé le glutaraldéhyde, l'hydroxyadipaldéhyde et le glyoxal. On a montré in vitro que ces deux derniers exerçaient vis-à-vis de l'enzyme une action inhibitrice plus réduite que le glutaraldéhyde ; ils fixent au contraire plus lentement et moins bien les infrastructures cellulaires.

Des tranches très minces d'aiguilles ont subi les préfixations suivantes :

1. Glutaraldéhyde à 3 % dans du tampon cacodylate 0.1 M pH 6.65 additionné de 5 % de saccharose pendant 15 minutes
   30 minutes
   60 minutes

2. Hydroxyadépaldéhyde (pH 4.9) à 10 % dans le même tampon pendant 1 heure
   4 heures
   8 heures

3. Glyoxal (pH 2.7) à 6 % dans le même tampon pendant 30 minutes
   60 minutes
   120 minutes

Les pièces sont ensuite lavées à plusieurs reprises dans le tampon. On effectue ensuite des coupes épaisses (30 microns) à -25° C dans un cryostat (Cryocut d'American Optical) que l'on met à incuber. Le milieu d'incubation a été préparé suivant la technique de CHIQUOINE (213), à partir de glucose 6 phosphate de baryum et de sulfate de potassium. Au moment de l'emploi, on dilue 10 ml du surnageant avec 20 ml d'une solution à 0,2 % de nitrate de plomb dans du tampon cacodylate et l'on filtre. L'incubation est réalisée pendant 5 h à 0°C, puis 30 minutes à 35 ° C. Après rinçage à l'eau saccharosée à 12 % on postfixe à l'acide osmique dans les conditions habituelles ; les ultracoupes sont observées sans contraste, les sites d'activité enzymatique étant représentés par un précipité de phosphate de plomb dense aux électrons. Pour l'observation au microscope normal, on effectue après l'incubation un bref rinçage à l'eau acidulée et l'on met en évidence le phosphate de plomb à l'aide d'une solution diluée de sulfure d'ammonium. Les coupes sont montées dans un milieu hydrosoluble.

### 1.7.2. Activité phosphatasique acide

La mise en évidence infrastructurale d'activités phosphatasiques acides a déjà été réalisée à de nombreuses reprises sur des matériels très divers et le protocole expérimental en est maintenant bien connu (15, 55, 57, 99, 104, 185). L'enzyme est plus résistante à la fixation que la glucose 6 phosphatase (148) et l'on peut prolonger légèrement la durée du séjour dans le glutaraldéhyde.

Les pièces sont préfixées pendant 45 minutes, 90 minutes ou 180 minutes dans les mêmes conditions que ci-dessus puis rincées abondamment, débitées en coupes minces au cryostat dans les mêmes conditions que ci-dessus, et placées dans

le milieu de GOMORI standard au β-glycérophosphate. La formation non enzymatique de précipités de plomb peut être observée sur des coupes mises à incuber en présence de fluorure de sodium, ou en présence de nitrate de plomb seul sans milieu d'incubation.

Pour la microscopie optique, les coupes sont également traitées par une solution diluée de sulfure d'ammonium ou de nitrate d'argent. Pour l'étude infrastructurale les coupes sont postosmiées et incluses à l'épon. Les grilles ne sont pas colorées.

## 1.8. Extractions par la pronase et la ribonucléase

Les digestions enzymatiques constituent une autre approche du problème des localisations cytochimiques à l'échelle des ultrastructures. Les enzymes les plus couramment employées sont la pronase et la ribonucléase. Nous avons également utilisé d'autres enzymes (pectinase, cellulase) pour étudier la structure fine de la paroi. Les conditions d'emploi en sont exposées au paragraphe 1.4.2.

### 1.8.1. Action de la pronase

La pronase (45 000 PUK/g) est une enzyme protéolytique non spécifique réduisant très activement les complexes protéiques à l'état de polypeptides, puis d'acides aminés qui passent en solution dans le milieu d'incubation. Elle est utilisée en solution à 0,5 $‰$ dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7.2 additionné de 5 % d'éthanol (12,204). Les coupes d'objets préfixés au glutaraldéhyde sont incubées pendant 18 h à 37° C, puis rincées et postosmiées.

On peut également effectuer les digestions enzymatiques sur grilles, après oxydation des coupes ultra-fines selon la technique de MONNERON (191, 192). Les grilles sont traitées par l'eau oxygénée à 10 volumes pendant 15 minutes puis placées sur des gouttes d'une solution de pronase à 0,5 % dans l'eau distillée ajustée à pH 7,4 par la soude 0,01 N, pendant 30 mn,2 h, 6 h et 24 h. Les coupes sont ensuite rincées et colorées à l'uranyle/plomb comme de coutume.

### 1.8.2. Action de la ribonucléase

La ribonucléase agit par dépolymérisation des acides ribonucléiques. L'enzyme (ribonucléase pancréatique lyophylisée Merck 20 U/mg) est utilisée en solution à 0,5 $‰$ dans de l'eau tri-distillée ramenée à pH 7,45 à l'aide de soude 0,01 N, et les pièces de tissu préfixées au glutaraldéhyde incubées pendant 30 mn, 3 h, 6 h, 21 h. Après rinçage, elles sont postfixées et incluses comme de coutume (229). Les extractions enzymatiques sur grilles sont réalisées dans les mêmes conditions que pour la pronase (solution à 0,5 %).

Dans les deux cas des témoins incubés dans les mêmes conditions, mais dans des solutions dépourvues d'enzymes, permettent d'apprécier les altérations non enzymatiques.

## 1.9. Techniques autoradiographiques

Cette étude de l'incorporation de $^{14}CO_2$ par voie photosynthétique a été réalisée sur des "arbres frères" de même âge (issus de greffes du même parent) poussant en forêt : ils présentent donc entre eux une très grande similitude.

| | | 1 h 30 | 6 h | 1 j | 2 j | 4 j | 5 j | 7 j | 10 j |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Février 1972 | Feuilles 1970 | | + | | | | | | |
| | Feuilles 1971 | | + | + | | | | | |
| Juin 1972 | Feuilles 1970 | | + | | | | | | |
| | Feuilles 1971 | + | + | + | | | + | | |
| | Feuilles 1972 | | + | | | | | | |
| Novembre 1972 | Feuilles 1972 | | + | | + | + | | + | + |

Tableau 3 - Epoques et durées d'incorporation de $^{14}CO_2$ dans les aiguilles

Pour chaque période considérée, trois niveaux différents (milieu-base-brachyblaste) ont été fixés dans deux mélanges fixateurs (voir le texte).

L'expérimentation a été réalisée à 3 époques différentes :

- en février 1972
- en juin 1972, époque d'activité photosynthétique intense et de migration rapide hors des sites de synthèse
- en novembre 1972 ; l'arbre est alors, comme en février, en période de repos. On a simplement étudié la migration du $^{14}C$ sur des périodes plus longues qu'en février.

Le détail des prélèvements effectués est rapporté dans le tableau 3.

L'étude autoradiographique réalisée l'a été conjointement à une étude biochimique détaillée. Cette étude, effectuée par un autre groupe de chercheurs du Laboratoire (1), a eu pour but de quantifier l'incorporation du $^{14}C$ (en fonction de l'activité spécifique du gaz initialement fourni), de préciser les substances marquées (et d'ébaucher une cinétique de marquage in situ) et enfin d'apprécier les zones de migration et la rapidité avec laquelle elle s'effectue. Des prélèvements systématiques ont été effectués non seulement sur les aiguilles mais également sur les branches qui les portent, à divers niveaux vers le haut (en direction du bourgeon terminal) et vers le bas (en direction des racines). Pour chaque niveau dans le rameau, on a séparé une fraction périphérique "écorce + liber" et une fraction interne correspondant au bois. Chacune de ces fractions après fixation à l'éthanol à 70° bouillant a été analysée quant à sa teneur en substances hydrosolubles (fraction "glucidique") et en substances solubles dans l'éther (fraction "lipidique"). Dans certains cas également a été réalisée une hydrolyse chlorhydrique des fractions afin de mettre en évidence le marquage lié à des fractions non hydrosolubles mais hydrolysables (amidon, polyphénols, pectines). Pour l'ensemble de ces échantillons, une aliquote a été mise en solution dans un scintillateur approprié et le rayonnement mesuré au compteur à scintillation.

Cette analyse biochimique du problème, qui requiert une expérimentation considérable, permet une analyse très fine de la migration du $^{14}C$, tant en ce qui concerne sa direction que son importance. Elle fournit une information complémentaire très importante à l'étude autoradiographique statique que nous n'avons effectuée que sur des aiguilles.

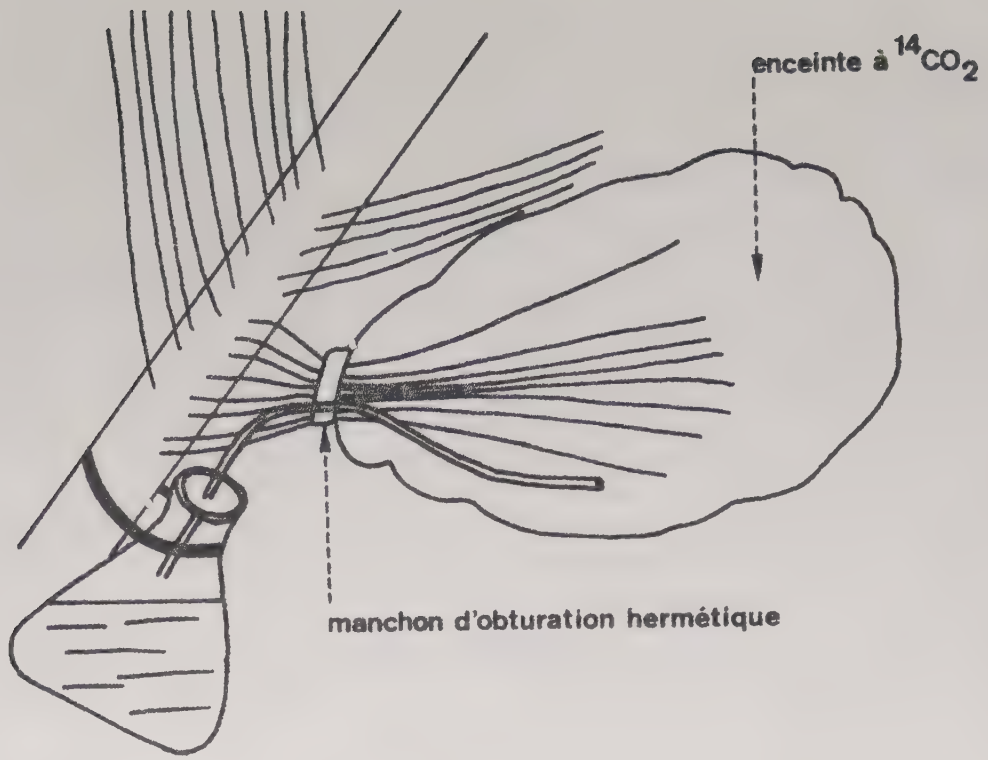
Pour préciser le rôle éventuel joué par le tissu de transfert dans la translocation des produits formés au niveau du chlorenchyme périphérique, nous avons étudié les modalités d'incorporation du $^{14}CO_2$ dans les aiguilles par voie photosynthétique.

### 1.9.1. Technique d'incorporation

On prépare au laboratoire du $^{14}CO_2$ par action d'HCl dilué sur de l'acétate de sodium marqué qui est conservé dans des erlenmeyers soigneusement bouchés. On crée autour de chaque groupe de feuilles à traiter une enceinte close que l'on remplit de gaz carbonique "chaud" dans les conditions d'étanchéité nécessaires (voir schéma page suivante).

---

(1) Colette BERNARD-DAGAN, Anne MARPEAU-BEZARD, Ginette PAULY, Christiane FILLON, Michel GLEIZES ont assumé la totalité de l'expérimentation nécessaire. Qu'ils en soient ici très vivement remerciés.




Les aiguilles sont maintenues en atmosphère enrichie en $^{14}CO_2$ pendant 1 h à 6 h puis laissées in situ, à l'air libre, pendant des durées allant de 1 h à 10 j.

1.9.2. Modalités de prélèvement et de fixation

L'aiguille et le brachyblaste attenant sont détachés du rameau avec un "talon" d'écorce. Le matériel est rapidement transporté au laboratoire et fixé. Trois niveaux sont considérés :

- le milieu de l'aiguille, placé dans la poche en plastique, qui a fait l'objet d'une incorporation directe de $^{14}CO_2$
- la base de l'aiguille, hors de la poche
- le brachyblaste

L'observation de ces deux derniers niveaux permet de suivre la migration du $^{14}C$ dans l'aiguille et hors de l'aiguille et de déterminer les tissus par l'intermédiaire desquels s'effectue cette migration.

Des petits morceaux d'aiguille, débités à la lame de rasoir, sont fixés de deux manières différentes :

a) un premier lot subit une fixation classique glutaraldéhyde/osmium, selon la technique utilisée pour l'étude infrastructurale ;

La préservation des structures est très bonne mais l'on peut s'attendre à des pertes considérables de substances hydrosolubles lors de la fixation, des rinçages dans le tampon, de la déshydratation et de l'inclusion. Par contre une fraction appréciable des lipides et la quasi totalité des substances hydrolysables sont conservées.

L'inclusion est réalisée comme de coutume à l'épon, contenant à parties égales un médium épon 812 + DDSA et un médium épon 812 + MNA, additionné de DMP 30.

b) un deuxième lot subit une fixation au méthanol saturé d'hydroxyde de baryum et d'hydroxyde de strontium, à - 75° C. Le récipient contenant la solution méthanolique saturée est placé dans une enceinte isolée remplie d'éthanol absolu additionné de glace sèche. Les tranches minces d'objet sont placées dans cette solution jusqu'à réchauffement à la température ambiante (18 - 24 h).

Cette méthode suggérée initialement par OKAMOTO et UEDA (213), a été adaptée par MULLER (195) puis GEYER (102) et STILLER (268, 269). Elle a récemment été reprise par KOSHUCHOWA et GÖRING (163) sur du matériel végétal. Le fondement théorique en est simple : à basse température, les oses (essentiellement hexoses et pentoses) se combinent avec les alcalino-terreux pour former des complexes insolubles dans le méthanol. La baryte se combine essentiellement avec les hexoses (glucose) et l'hydroxyde de strontium avec les pentoses (xylose, arabinose). Le saccharose ne réagit apparemment pas dans les conditions expérimentales. On pouvait donc espérer avec cette méthode conserver au moins une partie de la fraction glucidique hydrosoluble, probablement entièrement perdue avec la technique précédente. Les mesures comparatives effectuées au compteur à scintillation montrent que les pertes globales en substances hydrosolubles se situent aux environs de 50 % ; la méthode peut donc être considérée comme satisfaisante d'autant que certaines petites molécules hydrosolubles (acides aminés) ne sont pas théoriquement conservées. Le contact avec l'eau est systématiquement évité au cours des étapes ultérieures.

Les objets sont ensuite soigneusement rincés au méthanol, pour éliminer les sels en excès puis, après passage à l'oxyde de propylène, inclus dans une résine très fluide à base d'ERL 4206 selon SPURR (261). Nous avons constaté en effet que les objets fixés selon cette technique étaient extrêmement résistants à l'infiltration par la résine et que l'epon, trop visqueux, fournissait des résultats désastreux. SPURR a proposé un milieu d'inclusion dans lequel les différents constituants ont été sélectionnés en raison de leur très faible viscosité. L'épikote est donc l'ERL 4206, le durcisseur du NSA, l'accélérateur du DMAE (ou S 1) et l'on ajoute un plastifiant (DER 736) sans lequel la résine finale est trop cassante. Après passage dans un mélange oxyde de propylène/résine finale, les objets séjournent une nuit dans la résine et sont placés à l'étuve à 60° C. Comme le souligne SPURR, la qualité de l'anhydride nonényl succinique influe de façon décisive sur les qualités de la résine obtenue : il faut utiliser du NSA spécialement purifié (Humphrey Chem. C°), sans quoi on obtient un milieu mou inutilisable. La formule "soft" de SPURR nous a fourni les meilleurs résultats.

1.9.3. Préparation des lames pour l'autoradiographie

A partir de blocs inclus à l'epon ou à l'ERL 4206,on prépare des coupes semi-fines (1,5 µ) recueillies sur des lames très propres, après étalement sur de l'eau bidistillée - après fixation glutaraldéhyde-osmium - ou sur du diéthylène glycol - après fixation au méthanol saturé d'hydroxydes. Pour chaque bloc, deux jeux de lames sont ainsi préparés et seront exposés pendant des durées différentes.

Après avoir été séchées à l'étuve, les lames sont ensuite enduites d'émulsion ILFORD L4 ou K5 diluée au 1/2 au bain-marie à 37° C et égouttées en position verticale. Elles sont ensuite placées dans des boites étanches, à 4° C, en présence d'actigel (232) (1).

---

(1) René LE MENN, assistant au Centre de Microscopie électronique de l'Université de Bordeaux I a bien voulu nous faire bénéficier de son expérience en matière d'autoradiographie ; tous les jeux de lames ont été enduits d'émulsion sensible par ses soins.

1.9.4. Développement, coloration, montage

La durée d'exposition la plus adéquate est appréciée sur un jeu de lames témoins toutes identiques. Lorsqu'elle est jugée suffisante, on développe les lames en blocs dans du révélateur $D_{17}b$ (au métol/hydroquinone), pendant 4 minutes à 17° C, et, après un bref rinçage à l'eau acidulée, on fixe 10 minutes dans l'hyposulfite à 30 %. Un lavage soigneux suit, et les coupes sont ensuite recouvertes de résine synthétique (Technicon) après dessiccation sur une platine chauffante. Nous avons observé des lames non colorées, ou colorées à la pyronine en solution aqueuse à 1 % pendant 30 secondes. Le choix d'un colorant a donné lieu à divers essais. La coloration ne doit pas être trop intense auquel cas elle gênerait l'examen du marquage, ni produire une illumination parasite en fond noir.

1.9.5. Examen des préparations

Si les conditions d'exposition et de développement des lames sont adéquates, la taille et la densité des grains d'argent produits sont suffisantes pour permettre un examen en fond clair à des grossissements moyens ou forts. L'émulsion L4 initialement utilisée, nécessite une observation à l'immersion à X100 et a donc été écartée. L'ILFORD K5 produit des grains élémentaires un peu plus volumineux (0.2 µ) parfaitement visibles en fond clair. L'observation en fond noir fournit cependant des images beaucoup plus précises et contrastées et elle se révèle très souhaitable lorsque le marquage est faible.

Un certain nombre de conditions doivent donc être remplies pour suivre la migration du $^{14}C$ à l'intérieur des tissus de l'aiguille. Le fixateur utilisé doit conserver une fraction appréciable des substances que l'on veut mettre en évidence, et les pertes ultérieures doivent être réduites au minimum au cours de la déshydratation et de l'inclusion. La pénétration de la résine doit être adéquate pour produire des coupes semi-fines de bonne qualité. L'émulsion doit être étalée sous forme d'une pellicule d'épaisseur homogène. La durée d'exposition et les conditions de développement (concentration du révélateur, température, durée) doivent aboutir à un compromis entre l'observation aisée du marquage (grains d'argent assez nombreux et volumineux) et un bruit de fond réduit, celui-ci se traduisant par la formation de grains d'argent indépendante de la présence de radioisotopes dans les coupes. Enfin la coloration, tout en facilitant le repérage visuel ne doit pas gêner l'étude fine de la distribution du marquage.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

## CHAPITRE II - ETUDE HISTOLOGIQUE DES CELLULES DE STRASBURGER FOLIAIRES

### Choix des critères pour la détermination des cellules albumineuses sur coupes histologiques

Dans les différents organes foliaires décrits ci-dessous, les faisceaux cribro-vasculaires sont entourés par un tissu de transfusion mixte dont une partie est en rapport anatomique et physiologique avec le bois, l'autre avec le phloème. Parmi les cellules parenchymateuses vivantes, certaines sont situées contre le phloème et présentent des caractères morphologiques qui les distinguent des éléments criblés et des cellules des rayons d'une part, des cellules parenchymateuses de transfusion d'autre part. Il s'agit de cellules à paroi d'épaisseur moyenne (intermédiaire entre la paroi mince des cellules des rayons et la paroi épaisse des cellules vivantes de transfusion), mais surtout très chromophile , le plus souvent vivantes chez l'adulte. Le vacuome est souvent réduit, et surtout il ne contient jamais de polyphénols. La paroi cellulaire présente des épaississements très importants, et ceci constitue le caractère le plus apparent. On constate que ces expansions de la paroi sont situées sur toutes les faces de la cellule et traversées par de nombreux plasmodesmes.

Les points de contact avec les cellules les plus externes sont représentés le plus souvent par des zones ponctuées primaires aplaties. La relation avec la première rangée d'éléments criblés s'établit par l'intermédiaire de structures mixtes, mi-zone criblée du côté du phloème, mi-épaississement plasmodesmique du côté des cellules albumineuses contiguës.

On voit donc que, en dehors de toute considération d'ordre cytologique, la cellule albumineuse est aisément reconnaissable, dans les organes foliaires, par ses épaississements pariétaux et l'absence de polyphénols intravacuolaires. Ces expansions de la paroi sont surtout développées entre cellules albumineuses contiguës et non pas spécialement vers le phloème. Enfin les cellules de STRASBURGER constituent toujours un massif cellulaire distinct et non pas des éléments indépendants d'un système parenchymateux quelconque.

Pour la commodité du texte on utilisera indifféremment, dans les pages qui suivent, les expressions : cellules albumineuses, cellules de STRASBURGER, tissu albumineux. En fait, cette terminologie nous paraît impropre et nous proposerons in fine une appellation qui nous paraît conforme au rôle supposé joué par ces cellules dans la physiologie de l'aiguille.

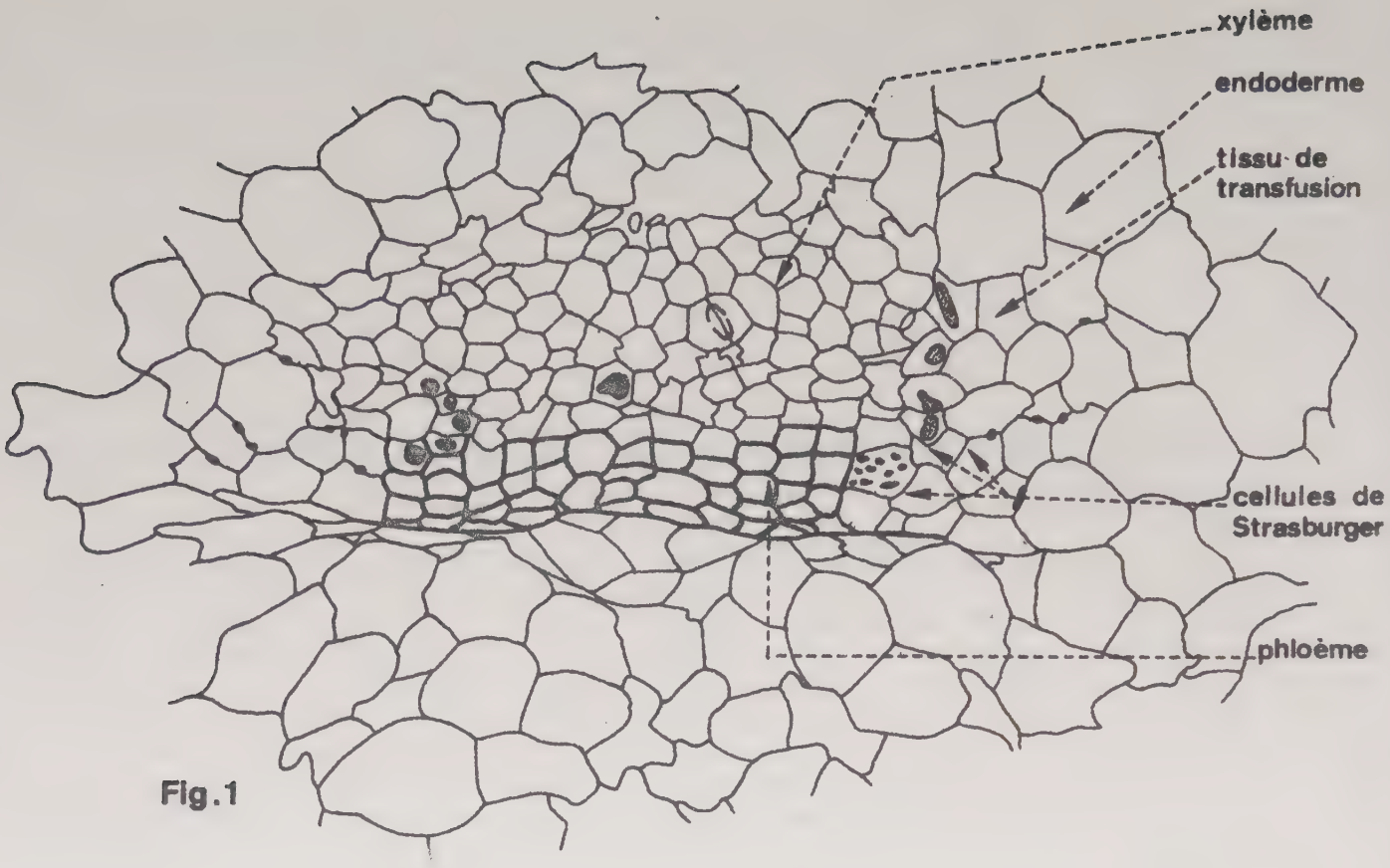



Fig.1

Fig.2

Fig.1 et 2 . Aspect histologique de la partie centrale d'un cotylédon (Fig.1) et d'une euphylle (Fig.2) coupés transversalement.

De l'embryon jusqu'à la plante adulte, le Pin possède successivement trois types de formations foliaires :

- les cotylédons se développent en même temps que s'allonge l'axe hypocotylé, après émission de la radicule hors de la graine. Ils sont au nombre de 5. Ils ont une forme effilée et une section triangulaire.

- les euphylles (ou "vraies feuilles") - selon la terminologie de GAUSSEN (101) - sont des feuilles courtes qui se forment au cours de l'allongement de l'axe épicotylé. Leur apparition n'amène pas immédiatement la chute des cotylédons qui coexistent un certain temps avec elles. Les euphylles sont minces et aplaties, de section plus réduite que les cotylédons. Elles persistent un certain temps sur la tige chez l'arbre jeune tandis que se différencient les formations foliaires définitives, les aiguilles ou pseudophylles.

- les pseudophylles, formations foliaires aciculaires de grande taille (jusqu'à 20 cm) sont rattachées au rameau long, ou mixiblaste, par l'intermédiaire d'un rameau court ou brachyblaste. Ces aiguilles représentent en fait, comme l'a montré GAUSSEN, l'extrémité distale du brachyblaste fendue longitudinalement. Selon les espèces de Pins, le nombre d'aiguilles portées par le rameau court est variable (de 1 à 5) ; elles correspondent alors, en section, à une fraction correspondante du brachyblaste qui les porte. Chez le Pin maritime, les aiguilles sont groupées par deux. Elles ont donc une section semi-circulaire et leur appareil conducteur correspond, en première approximation, à la moitié du cordon vasculaire du brachyblaste.

## 2.1.- DISTRIBUTION DES CELLULES ALBUMINEUSES DANS LES DIVERS ORGANES FOLIAIRES.

### 2.1.1. Cotylédon

Le cotylédon adulte est limité par un épiderme non épaissi, à cuticule mince, sans sous-épiderme (Fig. 1). La partie périphérique de l'aiguille est occupée par un chlorenchyme dépourvu de polyphénols ; il ne renferme pas de canaux sécréteurs et il est limité intérieurement par un endoderme différencié constitué de cellules arrondies ménageant entre elles des méats. Les tissus conducteurs, placés en position centrale, sont entourés par un tissu de transfusion de structure mixte : il est constitué d'une part de "cellules de transfusion", sortes de trachéides modifiées à paroi très mince et d'autre part de cellules parenchymateuses dépourvues de tanins.

Le faisceau cribro-vasculaire est unique et exclusivement constitué de tissus primaires. Le protoxylème a fait place à une lacune de résorption placée en position apicale. Le protophloème est complètement écrasé par le développement ultérieur des éléments criblés de métaphloème. Entre les éléments de métaxylème, disposés de façon assez anarchique, et le métaphloème, s'intercalent une assise ou deux de cellules d'aspect cambial, non fonctionnelles. Le métaphloème est constitué par la juxtaposition très ordonnée de 3 à 4 rangées d'éléments criblés à paroi mince, à cribles peu développés.

De chaque côté du faisceau conducteur, on observe en coupe transversale 3 ou 4 cellules albumineuses dont la taille est intermédiaire entre celle des éléments criblés, plus petits, et les cellules de transfusion. La paroi des cellules albumineuses est assez mince mais possède localement des épaississements pariétaux très différenciés (Pl. 2, j). Elles sont en rapport avec le tissu de transfusion d'une part, et le métaphloème d'autre part. Un certain nombre de cellules albumineuses apparaissent écrasées, au contact de la zone de résorption du protophloème. Cela laisse supposer que la différenciation des cellules de STRASBURGER, dans le cotylédon, se fait en deux temps : une première

différenciation s'effectuerait au moment de l'élaboration des éléments de protophloème dans le cordon procambial ; puis, en même temps qu'apparaîtraient les premiers éléments de métaphloème - et cette apparition coïncide avec la disparition progressive du protophloème - d'autres cellules indifférenciées jusqu'alors, se transformeraient en cellules albumineuses.

2.1.2. Euphylle

Elle est limitée extérieurement par un épiderme à paroi mince, dont la cuticule est plus épaisse que dans le cotylédon (Fig. 2). Il n'y a pas non plus de sous-épiderme. Le chlorenchyme sous-jacent est également constitué de cellules arrondies, à parois minces, séparées par des méats. Contre l'épiderme, à chaque extrémité du grand axe du faisceau vasculaire, se trouve un canal sécréteur rudimentaire. A l'intérieur de l'endoderme, le faisceau cribro-vasculaire est entouré par un tissu de transfusion peu développé, mais bien différencié. Les cellules parenchymateuses, à paroi plus épaisses que les trachéides, ne contiennent pas de polyphénols. Le faisceau est séparé en deux parties jointives par un rayon qui réunit la lacune de résorption du protoxylème au protophloème écrasé.

Le métaxylème est constitué de trachéides bien lignifiées. Une assise cambiale non fonctionnelle le sépare du métaphloème constitué de 3 rangées d'éléments criblés disposés en files radiales, aux parois assez fortement épaissies. Sur les flancs du massif de phloème, les cellules albumineuses constituent un amas de 4 à 5 cellules de taille intermédiaire entre les éléments criblés et les cellules de transfusion. Leur paroi, fortement chromophile, présente en de nombreux endroits des épaississements dans lesquels sont regroupés les plasmodesmes (Pl. 2, k). Ces épaississements sont plus nombreux que dans les cellules albumineuses des cotylédons, mais individuellement moins importants. Au contact du protophloème résorbé on observe également des cellules albumineuses comprimées, dépourvues de contenu.

On voit donc que dans l'euphylle, comme dans le cotylédon, les cellules albumineuses semblent dériver d'un mérisième primaire dont la différenciation s'effectuerait en deux temps, comme celle des éléments conducteurs. Les cellules albumineuses contiguës au protophloème disparaissent en même temps que les éléments criblés qui le constituent et sont finalement écrasées comme eux. Cet écrasement est produit par la multiplication des cellules juxtaposées au métaphloème en formation, et par leur accroissement ultérieur.

2.1.3. Pseudophylle

L'organisation anatomique de la pseudophylle adulte est fondamentalement la même que celle des feuilles qui la précèdent chez les plantes jeunes. Elle n'en diffère surtout que par la présence de divers tissus de soutien destinés à conférer à cet organe allongé une certaine rigidité. En outre le faisceau vasculaire très développé est partiellement constitué de tissus secondaires produits par l'activité d'une zone génératrice cambiale.

A l'intérieur du parenchyme plissé, les tissus internes de l'aiguille sont nettement délimités par une assise de cellules allongées dans le sens péricline, à laquelle on est convenu de donner le nom d'endoderme car ces cellules possèdent un épaississement de Caspary sur les parois tangentielles. En période hivernale elles ont un contenu granulaire encore non identifié (45), qui fait en partie place à de l'amidon pendant le printemps et l'été.

Les deux faisceaux cribro-vasculaires centraux sont entourés par un tissu particulier que les auteurs anglo-saxons nomment tissu de transfusion sensu lato ; mais certains auteurs préfèrent l'appellation de péridesme. Il s'agit en fait d'un tissu double, constitué par la juxtaposition de cellules parenchymateuses vivantes d'une part, de "cellules de transfusion" dépourvues de contenu cellulaire d'autre part. Les cellules parenchymateuses, arrondies, à paroi épaissie, sont essentiellement occupées par une vacuole centrale tannifère. Le cytoplasme pariétal renferme quelques chloroplastes pouvant devenir amylifères. Les cellules de transfusion ont au contraire une paroi mince, lignifiée pourvue de ponctuations aréolées. On les assimile le plus souvent à des trachéides modifiées. Bien qu'intimement mélangés au sein du tissu de transfusion, ces deux types cellulaires constituent en fait deux systèmes physiologiques tout à fait indépendants qui ne présentent entre eux que des rapports de contiguïté. Cellules parenchymateuses tannifères et cellules de transfusion sont issues de la différenciation du même méristème primaire. Le système de transfusion sensu stricto est assez bien connu (144, 173). Constitué d'éléments ligneux aplatis et ponctués, il jouerait un rôle essentiel dans la régulation hydrique de l'aiguille.

On sait au contraire peu de choses sur les cellules parenchymateuses tannifères et leurs relations avec les autres tissus vivants de l'aiguille. Depuis l'endoderme jusqu'au faisceau, elles sont toutes en relation par l'intermédiaire de zones ponctuées primaires, et cet assemblage cellulaire s'abouche finalement aux cellules de STRASBURGER, elles-mêmes contiguës au phloème. Les tissus conducteurs sont représentés par deux faisceaux cribro-vasculaires symétriques, de forme ovale, séparés par quelques assises de cellules pour la plupart subérifiées.

Le bois est essentiellement constitué de métaxylème et de deux couches de bois secondaire, sous forme de trachéides plus aplaties. Le protoxylème est en grande partie résorbé. Les éléments criblés sont tous secondaires dans l'aiguille adulte ; la régression du métaphloème intervient dès avant la fin de la phase de croissance de l'aiguille. Bois et liber sont séparés par deux assises de cellules cambiales dont l'activité entraine un renouvellement partiel des éléments criblés au cours des deux années suivantes. La production de trachéides secondaires ne s'effectue qu'au cours de la première année.

La structure décrite sur des coupes transversales correspond à celle observée dans toute la partie moyenne de l'aiguille. Elle est cependant différente à la pointe de l'aiguille, et à la base.

A la pointe de l'aiguille, il n'y a pas division dichotomique du faisceau libéro-ligneux ; celui-ci est unique. On constate en outre que les tissus ligneux sont seuls présents à l'extrême pointe, le phloème n'apparaissant qu'un peu plus bas. De plus, les tissus conducteurs sont exclusivement primaires - métaxylème et métaphloème. L'activité cambiale ne se manifeste qu'à une certaine distance du sommet, et elle est d'autant plus importante qu'on se rapproche de la base. Elle est encore discrète au sommet de l'aiguille dans les faisceaux conducteurs déjà indépendants, mais peu développés, et se manifeste en premier lieu sur les flancs des faisceaux au contact du tissu albumineux. Il faut souligner enfin que la pointe n'est constituée, dans l'aiguille adulte, que par des tissus nécrosés non fonctionnels, donc à vocation transitoire.

A la base de l'aiguille, dans sa partie incolore recouverte de gaines, les faisceaux conducteurs sont très développés et il s'y manifeste une activité de nature variée. Le chlorenchyme plissé disparaît pour faire place à un parenchyme banal constitué de cellules arrondies, polyphénoliques, dépourvues de chloroplastes. Les trachéides de transfusion sont plus nombreuses et plus développées. Enfin, à la partie supérieure (adaxiale) de l'aiguille, au dessus du

xylème, on observe de nombreuses fibres sclérenchymateuses qui contribuent à donner à l'aiguille une plus grande rigidité.

Au sein des aiguilles adultes du Pin maritime, les cellules de STRASBURGER constituent sur les flancs des faisceaux libéro-ligneux deux massifs cellulaires d'environ 110 µ de long sur 70 µ de large, disposés dans le prolongement immédiat du phloème secondaire et composés en coupe transversale de 25 à 30 cellules chacun (Pl. 1, a). Limités à leur partie supérieure par les trachéides courtes du tissu de transfusion associées au xylème, ils sont latéralement en relation avec les cellules parenchymateuses tannifères du même tissu et ceinturés sur la face inférieure par une assise de cellules contenant des tanins ou de l'amidon, selon la saison. Parmi ces cellules, certaines contiennent des cristaux d'oxalate de calcium et sont dépourvues de protoplasme dans l'aiguille adulte.

Les cellules de STRASBURGER se distinguent des éléments criblés du phloème par leur diamètre plus important et l'absence de paroi nacrée secondaire. Elles diffèrent également des cellules vivantes du tissu de transfusion car ces dernières possèdent un vacuome développé riche en tanins. Elles apparaissent arrondies en section, à paroi assez mince, sans méat intercellulaire.

Le tissu albumineux borde les faisceaux sur toute la longueur de la pseudophylle, depuis l'extrême pointe, mais il s'atténue à sa partie inférieure et disparaît finalement dans la base incolore de l'aiguille, recouverte de gaines, qui assure la transition avec le brachyblaste. Signalons dès maintenant que ni dans le rameau court, ni dans l'auxiblaste, les cellules albumineuses ne sont regroupées en un tissu extérieur au phloème ; elles sont au contraire mêlées aux éléments criblés et aux cellules parenchymateuses, comme dans le tronc.

L'observation vitale et l'étude histologique permettent de distinguer au sein du tissu albumineux trois types de cellules, dont la longueur augmente de l'extérieur vers l'intérieur du tissu, en même temps que leur diamètre décroît :

- des cellules externes chlorophylliennes,
- des cellules médianes,
- des cellules internes.

## 2.2.- ETUDE HISTOLOGIQUE DES CELLULES ALBUMINEUSES DE L'AIGUILLE

### 2.2.1. Les cellules chlorophylliennes

Elles sont le plus souvent placées sur le bord externe du tissu, contre les cellules parenchymateuses du tissu de transfusion, parfois déjetées vers le bas. On en observe aussi parfois à la partie supérieure (adaxiale) du tissu, contre les trachéides courtes de transfusion. Plutôt arrondies en section, elles apparaissent quadrangulaires, rectangulaires ou trapézoïdales en coupes longitudinales (Pl. 1, b). Le noyau, sphérique, est central. Il est souvent flanqué d'une goutte lipidique volumineuse ; le reste des inclusions osmiophiles est pulvérisé dans la masse cytoplasmique. Les vacuoles sont très développées, mais leur contenu n'est pas conservé par les techniques habituelles de fixation. Elles ne renferment jamais de tanins. Les chloroplastes très nombreux, distribués dans tout le cytoplasme, se groupent souvent autour du noyau de manière caractéristique. Ils élaborent de l'amidon en période d'amylogénèse normale de l'aiguille (mars à octobre). Il n'y a pas habituellement d'amidon hivernal. Les cellules chlorophylliennes sont en relation avec les cellules vivantes de transfusion par l'intermédiaire de zones ponctuées amincies, tandis qu'entre cellules chlorophylliennes voisines, ou au contact des cellules médianes, peuvent exister des épaississements pariétaux dans lesquels sont inclus des plasmodesmes digités disposés en bouquet.

Les cellules chlorophylliennes situées à la partie supérieure du tissu, contre les trachéides courtes, ont la même structure, mais sont plus allongées en raison de leur position plus interne.

La longueur moyenne des cellules externes est de 37 µ (extrêmes 19 µ- 77 µ), leur largeur de 21 µ (extrêmes 10 à 31 µ).

2.2.2. Les cellules "médianes"

Elles représentent la plus grande partie des cellules albumineuses et constituent 4 à 6 assises entourant les cellules mortes et comprimées. Arrondies en section transversale - comme les cellules précédentes - elles apparaissent ovales ou plus ou moins rectangulaires en vue longitudinale avec des contours souvent irréguliers. Les dimensions de ces cellules sont très variables. Elles augmentent en moyenne de l'extérieur du tissu vers le phloème, mais à tous les niveaux peuvent coexister des cellules de taille et de forme très différentes dont le diamètre reste cependant constant (19 µ en moyenne). Ainsi, contre la zone externe, leur longueur moyenne est de 55 µ (extrêmes 37 µ- 91 µ), tandis que plus à l'intérieur elle est de 85 µ(extrêmes 51 µ- 154 µ). Comme nous le montrerons ultérieurement, ce parenchyme hétérogène a une origine primaire, comme les cellules chlorophylliennes contiguës. Le noyau est allongé dans le sens longitudinal. Les vacuoles sont multiples et très petites : le cytoplasme apparaît donc très dense en microscopie optique. De nombreuses gouttelettes lipidiques sont réparties dans tout le cytoplasme, sans concentration particulière. Les plastes sont incolores, sphériques, parfois très faiblement amylifères. Les plasmodesmes sont regroupés non dans des zones ponctuées primaires aplaties mais dans des expansions pariétales qui peuvent se présenter sous des aspects variés.

Les épaississements de la paroi sont généralement symétriques d'une cellule à l'autre. Il peut s'agir d'excroissances hémisphériques ou d'épaississements en plateau plus allongés. Parfois aussi la paroi émet à l'intérieur du cytoplasme de véritables digitations comparables aux "structures transfert" décrites dans les cellules accolées aux veinules conductrices de nombreuses Angiospermes (Pl. 1, c). Toutes ces expansions de la paroi sont parcourues par des plasmodesmes. La lamelle moyenne est souvent creusée,à leur niveau, d'un "canal central" où confluent les tubules plasmodesmiques. Les zones à plasmodesmes sont disposées sur toutes les faces de la cellule au contact de cellules vivantes, sans orientation préférentielle. Les cellules médianes s'appuient sur les éléments criblés les plus anciens situés sur la face abaxiale du faisceau (métaphloème). Elles sont en rapport avec eux par des structures pariétales mixtes, mi-plaque criblée, mi-zone plasmodesmique épaissie.

2.2.3. Les cellules "internes"

Peu nombreuses, elles constituent un petit massif de forme triangulaire situé dans le prolongement de la zone cambiale, au contact des trachéides courtes de transfusion et contre les éléments criblés les derniers formés (Pl. 1, a et Pl. 2).

Sur coupes longitudinales, elles apparaissent très allongées et rectangulaires (Pl. 1, d). Leur largeur est d'environ 10µ mais elles ont une longueur moyenne de 115 µ, pouvant atteindre 150 µ. Elles sont très régulièrement empilées et de même longueur et paraissent donc être produites par une zone génératrice. Leur aspect et leur structure sont en fait ceux de dérivées cambiales de fort calibre, à paroi épaissie. De part et d'autre du noyau central, très allongé, sont disposées deux très grandes vacuoles claires qui occupent la plus grande partie du volume cellulaire ; le cytoplasme ne constitue qu'une mince bande, pariétale et périnucléaire, riche en lipides.

L'accumulation de ces gouttelettes osmiophiles, de taille très homogène, caractérise en microscopie à lumière ces cellules internes. Leur paroi, plus mince que celle des cellules chlorophylliennes et des cellules médianes, présente des plasmodesmes peu nombreux, rudimentaires et disposés sur toutes les faces. Il n'y a aucune communication privilégiée avec les éléments criblés contigus. Lorsqu'elles sont vivantes, les cellules internes contiennent de l'amidon, mais jamais de tanins. Ce dernier caractère les distingue des cellules du parenchyme des rayons, avec lesquelles elles présentent par ailleurs de fortes analogies sur lesplansmorphologique et cytologique.

Le tissu albumineux des aiguilles a donc une structure hétérogène. Il est constitué de 3 types cellulaires différant par leur morphologie, leur taille et leur contenu. Les cellules intermédiaires "médianes" sont les plus nombreuses.

Il existe en outre chez l'aiguille adulte, au centre de chaque massif de tissu albumineux,un ensemble cellulaire plus ou moins comprimé dépourvu de contenu et situé dans le prolongement immédiat du phloème primaire écrasé du faisceau (Pl. 1, a et Pl. 2). Ces cellules centrales, qui ne sont plus représentées que par leur paroi, ont cessé de fonctionner à un stade précoce de la différenciation ; elles ont été ultérieurement écrasées par l'accroissement diamétral des cellules voisines. Leurs parois sont plus minces que celles des cellules albumineuses différenciées, les traces de plasmodesmes sont peu nombreuses et les épaississements pariétaux bien moins importants. Les rapports anatomiques suggèrent que ces cellules "albumineuses" étaient étroitement en relation avec les éléments de protophloème initialement différenciés et qu'elles ont dégénéré en même temps qu'eux.

## 2.3.- EVOLUTION DE LA STRUCTURE DU TISSU ALBUMINEUX SELON LE NIVEAU DE L'AIGUILLE

Le degré de différenciation du tissu de transfert et son importance relative par rapport au phloème sont variables selon le niveau considéré de l'aiguille

### 2.3.1. A l'extrême pointe de l'aiguille

Il y a, on l'a vu, un léger décalage entre le phloème et le xylème à la pointe, ce dernier étant seul présent à l'extrémité alors qu'il n'y a pas encore de tube criblé différencié. Dans cette région, ce sont des cellules albumineuses très étalées que l'on trouve au contact du xylème primaire et non des tubes criblés. Ces cellules, de grande taille, sont garnies de nombreux épaississements plasmodesmiques, et leur paroi, épaisse, est très chromophile (Pl. 2, a et b). On observe, comme à la base de l'aiguille, un massif de cellules comprimées par l'accroissement diamétral des cellules restantes, situé sur la face abaxiale. On peut donc considérer que le tissu albumineux est continu à l'intérieur de l'aiguille ; il est, dans la pointe, affronté au xylème et superposé au phloème.

### 2.3.2. Région terminale

L'apparition des éléments criblés de métaphloème juste sous le sommet a pour effet de rejeter peu à peu sur les flancs les cellules albumineuses, toujours très volumineuses et bien différenciées. Un peu plus bas encore dans l'aiguille, les deux faisceaux s'individualisent, le cambium devient fonctionnel et les premiers éléments criblés secondaires sont alors formés aux deux extrémités du faisceau. Les cellules albumineuses sont définitivement rejetées sur les flancs et présentent le même aspect général que dans la partie médiane de l'aiguille. Ce n'est qu'au niveau où le cambium devient fonctionnel qu'apparaissent les premières cellules "internes", de plus petit diamètre. Elles ont donc apparemment une origine secondaire.

La taille des cellules albumineuses, leur importance par rapport aux tissus conducteurs sensu stricto et leur degré de différenciation décroissent progressivement au fur et à mesure que l'on s'approche de la base de l'aiguille.

2.3.3. A la base de l'aiguille

La masse des tissus conducteurs augmente du haut vers le bas de l'aiguille, tandis que le nombre des cellules albumineuses diminue. Leur taille et leur degré de différenciation s'atténuent également. On observe en particulier la disparition des expansions plasmodesmiques caractéristiques. Ce processus est concomittant d'une modification morphologique des faisceaux qui adoptent, en s'approchant du brachyblaste dont ils sont issus, une configuration semi-circulaire plus proche de la structure de tige. On assiste donc à un processus d'enroulement sur les flancs, dans lequel est impliqué le tissu albumineux. Les cellules albumineuses, incluses à l'intérieur du faisceau se confondent bientôt avec des cellules parenchymateuses banales. Au moment de la jonction brachyblastique, il n'existe plus contre le phloème qu'une ou deux couches de cellules que rien ne distingue des cellules parenchymateuses avoisinantes. Comme celles-ci elles contiennent le plus souvent des polyphénols. La disparition des cellules albumineuses différenciées coïncide dans l'espace avec la modification des cellules du mésophylle.Celles-ci ont dans la plus grande partie de l'aiguille, une paroi "plissée" caractéristique et sont chlorophylliennes. A la base de l'aiguille, ces cellules deviennent arrondies et ne contiennent plus de chloroplastes : la partie basale de la pseudophylle incluse dans les gaines est incolore. Il y a un rapport direct entre la présence de tissus verts à la périphérie et de cellules albumineuses à paroi épaissie à proximité du phloème.

Si l'on étudie sur coupes sériées le raccord des quatre faisceaux cribro-vasculaires issus des deux aiguilles avec ceux du brachyblaste, on constate que même ces cellules parenchymateuses des flancs disparaissent très vite et que les éléments criblés issus de feuilles différentes viennent au contact sans que s'intercale entre eux la moindre cellule possédant les caractéristiques de cellules albumineuses énoncées plus haut. En outre, les cellules de parenchyme vertical se modifient progressivement et font place, dans le brachyblaste à des cellules plus courtes et de nature différente (Pl. 30, e). Ces systèmes parenchymateux morphologiquement différents sont sans doute, physiologiquement, en continuité.

2.3.4. Dans le brachyblaste et le rameau long

Il est classique d'admettre que des cellules albumineuses sont présentes, dans les tiges, au sein du parenchyme vertical et sur les marges des rayons horizontaux (Pl. 30, f). Dans la tige de Pinus pinaster, les rayons sont unisériés sauf quand ils renferment un canal sécréteur horizontal ; toutes les cellules radiales ont une densité cytoplasmique élevée mais, seules, les cellules marginales des rayons sont en relation par l'intermédiaire de zones criblées avec les éléments du phloème (Pl. 30, f). Aucun autre caractère ne permet de distinguer ces cellules, qualifiées en général d'albumineuses, des autres éléments du parenchyme horizontal.

Les cellules parenchymateuses du système vertical ne présentent pas la densité cytoplasmique caractéristique des cellules des rayons. De forme très allongée, à vacuome polyphénolique ou non, elles présentent occasionnellement des communications avec l'élément criblé (Pl. 30, g). Elles ne possèdent ni différenciations pariétales, ni caractères cytologiques spécifiques.

Il n'y a donc pas dans le brachyblaste ni dans le rameau long de cellules albumineuses morphologiquement comparables à celles décrites dans les feuilles : il n'existe pas d'épaississements plasmodesmiques et les relations

avec les tubes criblés s'effectuent par l'intermédiaire de cribles simples et non de structures mixtes comme dans les pseudophylles. Nous pensons cependant que les cellules des rameaux possédant un cytoplasme dense et un vacuome non tannifère peuvent être comparées aux cellules albumineuses foliaires, mais elles ne semblent pas pouvoir être confondues sous le même nom en raison de l'absence d'expansions pariétales.

2.3.5. Conclusion

Le tissu albumineux constitue dans l'aiguille un ensemble de cellules différenciées situées à proximité immédiate du phloème. Cet ensemble de cellules est constitué de trois types cellulaires distincts ; les cellules médianes, intermédiaires, sont les plus nombreuses. Elles sont étroitement en relation entre elles par l'intermédiaire de zones plasmodesmiques le plus souvent épaisses. L'importance relative du tissu albumineux et des tissus conducteurs, phloème en particulier, ne cesse de décroître depuis la partie sommitale de l'aiguille jusqu'à sa base. Dès avant la fusion des deux pseudophylles en un rameau court, le tissu albumineux a entièrement disparu, alors que les massifs cribro-vasculaires atteignent leur développement maximum. Vers la base de l'aiguille, la densité cytoplasmique, le nombre et l'importance de la paroi diminuent ; au niveau du point d'attache des aiguilles sur le brachyblaste, il n'y a plus de cellules albumineuses reconnaissables.

Dans le brachyblaste, le tissu de transfert périphérique est absent. Mais on observe au contraire le développement important d'un système parenchymateux situé entre les éléments criblés, qui assure la transition avec le système mixte caulinaire (parenchyme vertical et marge des rayons ).

Il n'y a donc pas dans la structure de tige continuité du tissu de transfert tel qu'il apparaît dans l'aiguille. La présence de"structure transfert" est en rapport non avec le développement du phloème, mais avec la présence, à la périphérie de tissus photosynthétiques. On ne peut exclure cependant la présence, dans les tiges, de cellules comparables aux cellules albumineuses de l'aiguille, bien que morphologiquement moins différenciées.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

## CHAPITRE III - ETUDE INFRASTRUCTURALE DES CELLULES DE STRASBURGER DE L'AIGUILLE ADULTE.

L'étude anatomique a donc montré que le tissu albumineux est constitué non pas d'un type cellulaire unique, mais de trois groupes de cellules à l'intérieur desquels on observe même une certaine différenciation. Il importe de savoir si à ces variations morphologiques correspondent des modifications au niveau infrastructural. Après avoir examiné en détail les aspects cytologiques des différents types cellulaires dans l'aiguille adulte, nous procèderons à une étude précise des plasmodesmes et des portions de paroi dans lesquelles ils sont regroupés, la présence de zones plasmodesmiques développées constituant un aspect caractéristique des cellules de STRASBURGER.

### 3.1-CELLULES CHLOROPHYLLIENNES.

La paroi des cellules de STRASBURGER, d'épaisseur moyenne (0,6 - 0,7 µ) et de structure simple (pl. 3, fig. a), est séparée du plasmalemme par un espace périplasmique important, garni de microfibrilles lâches. Contre le plasmalemme on observe occasionnellement des microtubules d'aspect classique et des vésicules membranaires (= plamalemmasomes) allongées, bien plus abondantes chez les feuilles jeunes.

Les perforations pariétales sont regroupées à des niveaux particuliers, différenciés, de la paroi (pl. 1, fig. b ; pl. 3, fig. a ; pl. 12, fig. a).

Ces zones à plasmodesmes existent entre cellules chlorophylliennes et cellules parenchymateuses de transfusion, sous forme de zones ponctuées primaires minces, et au contact des autres cellules albumineuses ; elles sont alors le plus souvent épaissies (pl. 3, fig. a).

Les cellules chlorophylliennes possèdent un noyau volumineux limité par une double membrane très visible percée de nombreux pores ; dans le nucléoplasme, l'hétérochromatine constitue des aggrégats épais (pl. 3, fig. a).

Au sein du cytoplasme de ces cellules, les ribosomes sont libres ou groupés en petits polysomes (pl. 3, fig. b et pl. 6, fig. a et d) ; ils ont une répartition très homogène (pl. 3 fig. a). Une goutte lipidique de grande taille est le plus souvent accolée au noyau volumineux, placé en position centrale (pl. 1, fig. b). Le reste du matériel lipidique est constitué d'inclusions discrètes (0,5 à 1 µ), peu osmiophiles, réparties dans toute la cellule (pl. 3, fig. a).

Le reticulum endoplasmique est peu développé et exclusivement constitué de profils lisses plus abondants à la périphérie de la cellule (pl. 3, fig. a). On observe des figures d'abouchement, souvent décrites d'ailleurs, entre la membrane nucléaire et le plasmalemme, par l'intermédiaire de nappes de reticulum lisse. Ces nappes peuvent, exceptionnellement être accolées par deux ; elles sont alors séparées par une mince bande de cytoplasme, ce qui donne à l'ensemble une curieuse apparence tripartite (pl. 3, fig. b).

Le système vacuolaire est important : il est formé par 2 ou 3 grandes vacuoles situées à proximité immédiate du noyau, et par un vacuome périphérique beaucoup plus fragmenté, dont les divers éléments ne sont souvent séparés que par une mince bande de cytoplasme ou par l'apposition des membranes tonoplastiques (pl. 3, fig. a). Les vacuoles ont un contenu clair, mais renferment parfois des petites inclusions éparses non structurées. Elles ne contiennent jamais de tanins, ce qui les distingue nettement des cellules parenchymateuses contiguës.

Le chondriome est surtout constitué par des formes courtes, sphériques (pl. 3, fig. a), mais aussi parfois par des éléments plus allongés (pl. 6, fig. a). Toutes les mitochondries sont riches en crêtes ; ces dernières peuvent montrer des relations avec la membrane interne de la mitochondrie.

Examinés en fond clair, les plastes de la couche externe du tissu albumineux apparaissent sur le vivant colorés en vert. En fait, la totalité du plastidome de ces cellules est constituée par des chloroplastes ovoïdes (4 µ X 0,7 µ), parfois allongés et amincis, au système lamellaire peu développé (pl. 4, fig. a), ce qui les distingue des plastes du mésophylle.

Les deux feuillets de la double membrane limitante du chloroplaste sont séparés par un espace clair d'environ 15 nm. Il existe le plus souvent des thylacoïdes isolés, discontinus, disposés parallèlement à la double membrane limitante et à une distance d'environ 40 nm de celle-ci. Ces thylacoïdes proviennent d'invaginations de la membrane plastidale interne (pl. 4, fig. b). Celle-ci est également en relation en de nombreux endroits avec un reticulum périphérique. Ce système membranaire, situé entièrement à l'extérieur des lamelles granaires, est constitué par un enchevêtrement complexe de tubules étroitement anatomosés, surtout abondants aux extrémités du plaste (pl. 4, fig. a). Les relations de ce reticulum avec les thylacoïdes périphériques ne sont pas claires mais il est probable que les tubules correspondent à des expansions locales des lamelles. Tous ces systèmes membranaires paraissent en relation avec les thylacoïdes granaires. (pl. 3, fig. b).

Le système granaire, peu développé, est constitué par 3 ou 4 petits groupes de lamelles qui différencient des empilements peu importants, dont les saccules, fortement évasés, sont groupés par 4 ou 5 (pl. 4, fig. a et b).

Le stroma des plastes est assez clair et présente localement des zones plus chromophiles, qui ne paraissent pas constituées de ribosomes (pl. 4, fig. a). Outre les gouttelettes osmiophiles habituelles dispersées au sein de la masse plastidale , il n'est pas rare de rencontrer dans le stroma des chloroplastes des inclusions denses, d'aspect granuleux et de forme circulaire (pl. 4, fig. d et pl. 5, fig. a, b, c, d). Ces inclusions, beaucoup plus contrastées que le stroma environnant sont volumineuses (0,3 à 0,5 µ ) et limitées par une membrane unitaire. Examinée plus en détail, la masse chromophile centrale apparaît constituée d'un écheveau compact de structures filamenteuses denses aux électrons prenant appui par endroits sur la membrane limitante ; entre ces "points d'ancrage" apparaissent des espaces clairs semi-circulaires de 30 nm de rayon environ.

Ce type d'inclusions existe aussi bien chez des aiguilles très âgées (40 mois) que chez des aiguilles jeunes, mais adultes (10 mois).Leur présence, qui n'est pas constante, ne paraît donc pas associée à un stade juvénile du développement du chloroplaste.

Enfin, on peut rencontrer dans le cytoplasme des cellules chlorophylliennes des structures denses assez comparables à celles que nous venons de décrire dans le stroma des plastes ; situées généralement à proximité des parois, elles ont un diamètre de 0,3 à 0,4 µ mais ne sont pas limitées par une membrane. (pl. 5, fig. e).

A un certain stade d'évolution de la cellule chlorophyllienne, il est possible d'observer des formes d'altération des chloroplastes normaux, formes qui peuvent coexister au sein de la même cellule avec des plastes non modifiés (pl. 3, fig. c). Dans ce cas, le plaste prend une forme contournée, le système granaire régresse et se réduit à quelques saccules isolés très évasés. En même temps le réseau périphérique se développe et envahit la totalité du stroma. Un système tubulaire très dense finit par remplacer les thylacoïdes granaires. Il s'agit là d'une véritable dédifférenciation du chloroplaste qui s'accompagne très probablement de la disparition de l'activité photosynthétique. Elle peut s'observer chez des aiguilles déjà pleinement différenciées, mais encore jeunes cependant (10 mois)

Pendant les mois d'activité photosynthétique maximale (avril à octobre), les chloroplastes des cellules de STRASBURGER les plus externes peuvent devenir amylifères (pl. 1, fig. b et c). Les grains d'amidon, de taille moyenne (1 µ X 2 à 3 µ) prennent naissance à l'une des extrémités du chloroplaste et s'implantent en son centre par écartement du système thylakoïdal. Les plastes amylifères sont moins nombreux pendant la période hivernale et leur abondance constitue donc un caractère saisonnier.

On remarque en outre que les chloroplastes amylifères ne contiennent jamais d'inclusion chloroplastique dense. Il semble donc coexister en permanence dans les cellules chlorophylliennes des plastes amylifères, des plastes pourvus d'une inclusion dense et enfin des chloroplastes d'aspect classique, bien que pauvres en grana.

Les corps de Golgi, habituellement constitués par l'empilement de 5 ou 6 saccules, conservent dans la cellule adulte une activité importante, mais très inférieure cependant aux périodes antérieures au cours desquelles s'est édifiée la paroi cellulaire. Les formations golgiennes sont représentées soit par de petites vésicules claires, peu denses aux électrons, mesurant 60 nm de diamètre (pl. 6, fig. a) ; soit par des vésicules rugueuses ("coated vesicles") d'un diamètre légèrement inférieur (50 nm).

Au sein du hyaloplasme transitent des formations contenant des vésicules internes relativement denses. Il ne nous est pas possible de préciser si ces corps multivésiculaires, selon la terminologie usuelle, constituent des formes intermédiaires d'accumulation de précurseurs pariétaux ou s'il s'agit de vésicules pinocytiques impliquées dans un transfert actif de l'eau au sein de la cellule.

Dans les cellules chlorophylliennes et les cellules albumineuses foliaires en général, il n'est pas rare d'observer des microfilaments cytoplasmiques (pl. 6, fig. b et c). Ils se trouvent soit à l'état isolé, soit groupés en fibrilles de petit diamètre (30 nm) (pl. 6, fig. a) soit, le plus fréquemment, associés par 15 à 18 sous forme de fibres de 70 à 100 nm de diamètre (pl. 6, fig. b et c). Les microfilaments ont un diamètre de 10 à 13 nm, c'est-à-dire inférieur de moitié à celui des microtubules des mêmes cellules (pl. 38 ). Ils nous paraissent être formés par la juxtaposition longitudinale de sous-unités élémentaires courtes (250 nm ?). Les fibres constituées par l'assemblage de microfilaments sont le plus souvent rectilignes, parfois flexueuses et toujours orientées parallèlement au grand axe de la cellule. Elles sont disposées à proximité de la paroi, mais non contre elle comme les microtubules pariétaux. Il est difficile d'apprécier la longueur de ces fibres ; étant donné leur faible épaisseur, elles paraissent souvent discontinues. Nous avons pu cependant en suivre sur plus de 10 µ sans solution de continuité.

On discerne une substructure dans le microfilament, constitué d'une partie périphérique très dense aux électrons, épaisse d'environ 10 Å, et d'une partie centrale claire. Le regroupement des microfilaments en fibre cytoplasmique ne semble pas se faire au sein d'une enveloppe limitante. Ceci apparaît aussi bien sur les sections longitudinales de fibres (pl. 6, fig. c), que sur les coupes transversales (pl. 6, fig. d). Il faut préciser en outre qu'il est extrêmement rare d'observer des plans de section transversale de ces fibres.

Lorsque la croissance en longueur de l'aiguille est terminée, les cellules chlorophylliennes ne subissent plus de remaniements ultrastructuraux notables au cours de la vie de la feuille. En particulier, il n'y a pas d'augmentation du nombre des plastes agranaires par rapport au nombre de plastes granaires. Ces cellules semblent rester fonctionnelles jusqu'aux dernières semaines précédant la chute de l'aiguille.

3.2.- CELLULES MEDIANES.

Dans les cellules médianes, les tubules plasmodesmiques sont disposés en un bouquet convergent au sein d'épaississements pariétaux très différenciés (1,5 à 2 µ d'épaisseur par cellule et 4 à 7 µ de large), constituant des expansions faiblement arrondies ou même des protubérances semi-circulaires (pl. 1, fig. c, pl. 7 et pl. 12, fig. b). Ces zones différenciées de la paroi sont plus volumineuses que dans les cellules chlorophylliennes et proviennent d'un accroissement secondaire de la paroi, lié à des digitations des tubules plasmodesmiques.

Les zones épaisses à plasmodesmes sont surtout abondantes entre cellules médianes voisines, plus rares sur les parois contiguës aux cellules internes, absentes du côté des trachéïdes courtes.

Les ribosomes sont regroupés en volumineux polysomes (pl. 8, fig. a) ou constituent même des associations importantes et compactes disséminées au sein d'un cytoplasme dont la trame fibreuse, bien visible, correspond aux aspects décrits par BUVAT et POUX (1961) dans les tubes criblés de Cucurbita en cours de différenciation. Cette ségrègation hétérogène du matériel ribosomal contraste avec sa dispersion uniforme dans les cellules chlorophylliennes. Entre les paquets de ribosomes ainsi agglomérés apparaissent des particules de taille beaucoup plus réduite (7 nm), également regroupées et parfois disposées en chaînettes (pl. 5, fig. f et pl. 8, fig. a et b). Ces microparticules sont très visibles sur le fond clair du hyaloplasme. On pourrait supposer qu'elles préexistent, bien que masquées, dans les cellules chlorophylliennes. Il nous semble plus probable que leur apparition coïncide avec le processus de ségrégation des ribosomes en amas volumineux. Les microparticules constituent en réalité (pl. 5, fig. f et pl. 8, fig. b) des plans de section de structures tubulaires de même diamètre, qui garnissent également les ribosomes voisins.

L'aspect "dense" des cellules médianes s'explique donc non pas tellement par leur richesse en ribosomes mais par la multiplicité des organites cellulaires et des systèmes membranaires qu'elles renferment. En effet, ces cellules contiennent de nombreux plastes sphériques de grande taille (diamètre 1,7 à 2,7 µ), non chlorophylliens (pl. 7 et pl. 8, fig. c et d). La double membrane externe est parfois doublée par un ou deux thylacoïdes. A la périphérie du stroma assez dense, se trouve un réseau tubulaire comparable à celui observé dans les chloroplastes, mais beaucoup plus développé (pl.8,fig.c). Ce réseau s'étend parfois dans la partie centrale du plaste. En outre, 3 ou 4 thylacoïdes agranaires traversent habituellement la masse plastidale (pl. 8, fig. d). Exceptionnellement au sein de la masse plastidale peut être inclus un grain d'amidon de très petite taille. Ces plastes sont très apparents en microscopie photonique. Ils peuvent être facilement mis en évidence grâce à leur teneur élevée en phospholipides, par l'hématéine acide après postchromisation selon BAKER. On peut

obtenir des coupes minces en évitant les liposolvants en effectuant l'inclusion dans des polyéthyléneglycols cireux de haut poids moléculaire (46).

Il est fréquent d'observer, associés à la membrane externe des plastes, des éléments de reticulum rugueux. Ces profils allongés, longs de 30 nm, sont étroitement accolés à la double membrane du plaste dont ils ne sont séparés que par un espace clair de 10 nm, ce qui confère aux zones de jonction un aspect de membrane tripartite. Au contact du plaste, la membrane de reticulum est dépourvue de ribosomes (pl. 8, fig. c et d) ; elle en est normalement garnie par ailleurs.

On discerne en outre dans les cellules de STRASBURGER les signes d'une activité mitochondriale. Toujours très nombreuses les mitochondries constituent parfois des accumulations importantes à proximité immédiate des expansions pariétales riches en plasmodesmes. Il se pourrait cependant, que dans les aiguilles adultes, le rôle du chondriome soit déjà moins grand étant donné que nombre de mitochondries présentent des aspects autolytiques, ainsi d'ailleurs que certains plastes.

Contrairement à celles des cellules chlorophylliennes, les vacuoles des cellules médianes sont petites, nombreuses et réparties dans toute la cellule. Certaines contiennent des corps plurilamellaires qui représentent peut-être les restes membranaires de mitochondries et de plastes digérés par voie autolytique. D'autres vacuoles plus petites renferment des précipités denses aux électrons (pl. 9, fig. c) constitués au moins en partie de polysaccharides (pl. 9, fig. b). Les corps multivésiculaires qui fournissent également une réaction positive au test de Thiéry sont peu nombreux dans le cytoplasme. Cette raréfaction est peut-être en rapport avec une réduction de l'activité golgienne ; les dictyosomes et vésicules golgiennes sont moins nombreux que dans les cellules chlorophylliennes (pl. 8, fig. a).

Le reticulum endoplasmique est particulièrement développé sous sa forme lisse aussi bien que sous sa forme rugueuse et une certaine ségrégation semble se manifester entre les deux aspects. Les éléments de reticulum granulaire (pl. 9, fig. d) sont concentrés dans la partie centrale de la cellule alors que les canalicules et les nappes de reticulum lisse (pl. 9, fig. a) sont surtout disposés à la périphérie (pl. 7). Dans les cellules les plus évoluées, certains territoires cytoplasmiques sont délimités par des nappes concentriques superposées de reticulum lisse (pl. 9, fig. c). On constate, par l'examen d'images qui paraissent correspondre à des stades d'évolution, qu'au coeur de ces formations, il y a une disparition progressive des éléments figurés du protoplasme ; dans les cellules les plus évoluées, des volumes cytoplasmiques parfois importants ne contiennent plus alors que du hyaloplasme et des ribosomes épars (pl. 7).

Les profils réticulaires rugueux constituent soit des canalicules, sur lesquels en section les ribosomes sont disposés en spirale (pl. 9, fig. a), soit des nappes souvent associées à des organites.

Outre leur association avec les plastes, déjà mentionnée, les éléments de reticulum endoplasmique granulaire pourraient être associés à d'autres formations cytoplasmiques. On observe en effet dans les cellules médianes des aggrégats très denses aux électrons, de taille variable, que l'on peut qualifier en raison de leur structure, de formations morulaires (pl. 10). Les plus évoluées (1-1,5 µ) sont constituées d'un noyau dense, compact mais structuré, autour duquel sont disposées des sphérules plus chromophiles, dont les dimensions (0,1 µ) sont constantes. Elles tapissent la périphérie de la plateforme centrale (pl. 10, fig. a, b, e et f). Ces corpuscules ne possèdent pas de membrane et paraissent entourés d'un feutrage indistinct comparable à celui présent sur la membrane de certaines "coated vesicles" golgiennes.

L'ensemble de l'aggrégat est étroitement inscrit au sein de profils circulaires de reticulum lisse qui représentent très probablement des sections de canalicules, et ménagent un espace clair entre la formation morulaire et le hyaloplasme environnant (pl. 10, fig. a, b et d). A proximité immédiate, se trouvent habituellement des nappes parallèles ou concentriques de reticulum rugueux anastomosées en de nombreux points (pl. 10, fig. a et c). Contrairement aux profils circulaires entourant les aggrégats denses, les profils allongés sont abondamment garnis de ribosomes sur leur face externe. Bien que la relation entre ces deux groupes d'infrastructures ne soit pas évidente, il existe entre eux des rapports de contiguïté suffisamment nets pour qu'on ne puisse les dissocier.

Outre ces aggrégats morulaires complexes, il peut exister enfin des formes plus simples, qui ne sont pas nécessairement évolutives. On peut observer séparément des noyaux denses, plus petits, à peine garnis de vésicules chromophiles (pl. 10, fig. b), ou bien des sphérules isolées ou groupées, incluses dans de petites vacuoles. Ces dernières sont nombreuses dans les territoires cytoplasmiques délimités par des nappes circulaires superposées de reticulum lisse. Des aspects simples du même genre peuvent s'observer dans les cellules chlorophylliennes les plus évoluées. Ils diffèrent nettement des formations cytoplasmiques analogues aux inclusions chloroplastiques décrites plus haut dans les cellules chlorophylliennes ; ces dernières sont en effet constituées d'un écheveau d'éléments tubulaires et non d'un aggrégat de sphérules.

Il existe enfin dans les cellules médianes des fibres cytoplasmiques identiques à celles décrites dans les cellules chlorophylliennes.

Enfin, les cellules médianes contiennent de très nombreuses gouttelettes de triglycérides neutres que nous avons précédemment étudiés en microscopie photonique par les méthodes classiques d'investigation ou bien sur coupes minces sériées après fixation aldéhyde-osmium et inclusion dans des milieux hydrosolubles (47).

Entre cellules médianes voisines et même contiguës on peut observer des différences importantes concernant tant la densité des organites cytoplasmiques que leur degré de vitalité apparentes. Un des aspects particuliers de cette différenciation est constitué par les ribosomes, dont la densité et le degré de regroupement sont très variables selon les cellules. Il est difficile de dire si l'on est en présence d'un processus évolutif concernant l'ensemble des cellules médianes, mais se réalisant à un rythme différent selon les cellules, ou si au contraire ces aspects, précocement déterminés, ne se modifient pas au cours de la vie de l'aiguille.

### 3.3.- CELLULES INTERNES.

Dans les parois minces séparant les cellules internes entre elles, il y a peu de plasmodesmes (pl. 1, fig. a), et donc pas de zones ponctuées aussi différenciées que dans les types cellulaires précédents. Ces zones à plasmodesmes existent par contre en assez grand nombre sur les parois contiguës aux cellules médianes, et, plus rarement, du côté du phloème.

En effet, les cellules internes ne sont en relation par des plasmodesmes avec la première rangée d'éléments criblés que de façon épisodique (pl. 9, fig. a). Les zones de communication, quand elles existent, sont de type mixte : une zone à plasmodesmes épaissie du côté de la cellule de STRASBURGER est accolée à un demi-crible plus mince, pourvu de pores plus importants (pl. 13, fig. c). Cette structure diffère notablement de celle des cribles (pl. 13, fig. b) ; elle est analogue aux différenciations de la paroi mettant en relation les éléments criblés du phloème secondaire avec les "cellules des rayons" (pl. 13, fig. a).

Ceci suggère que les cellules internes pourraient constituer en fait la rangée la plus externe des cellules des rayons d'autant que leur morphologie (cellules parallélépipédiques très allongées) et leurs aspects infrastructuraux sont très voisins. Elles sont disposées en files régulières, comme les éléments criblés secondaires ; on ne peut pour autant leur attribuer une origine cambiale. Chez toutes ces cellules, la plus grande partie du contenu cellulaire est occupée par deux vacuoles très allongées, encadrant le noyau fusiforme placé en position centrale (pl. 1).Le cytoplasme, limité à une mince bande pariétale, présente chez l'adulte des signes de dégénérescence accentuée. La trame hyaloplasmique a presque disparu. Les ribosomes, quand il en reste, sont regroupés en associations compactes ou en aggrégats de type morulaire, analogues à ceux des cellules médianes.

La membrane des nombreuses mitochondries est intacte, mais les crêtes ont disparu. Les plastes, un peu mieux préservés, paraissent identiques à ceux des cellules médianes. Le reticulum endoplasmique et les dictyosomes ont complètement disparu (pl. 11, fig. a et b). Ces aspects de dégradation s'accompagnent d'une forte surcharge lipidique, qui est peut-être liée à cet état sub-léthal.

Dans l'aiguille adulte, les cellules internes ne sont donc pas fonctionnelles. Elles paraissent constituer une barrière entre le phloème et les parties plus externes, actives, du tissu albumineux. Il faut souligner enfin que leur présence n'est pas constante ; dans certaines aiguilles, les cellules médianes vivantes sont directement appliquées contre les premiers éléments criblés.

### 3.4.- ZONES A PLASMODESMES.

Leur présence dans les cellules de STRASBURGER a déjà été signalée à plusieurs reprises. Comme l'ont montré les travaux déjà anciens de HILL (1901 b), tous les types cellulaires de l'aiguille de Pin sont étroitement en relation par l'intermédiaire de ces "connecting threads". Mais dans le tissu de transfert, les zones à plasmodesmes sont en nombre élevé, la densité des pores est très forte ; enfin il est habituel qu'à leur niveau la paroi subisse des modifications morphologiques.

L'observation des coupes sériées au microscope optique montre qu'il y aurait en moyenne de 30 à 45 zones à plasmodesmes différenciées dans chaque cellule de STRASBURGER ; la longueur, ou le diamètre, de ces zones peut atteindre 5 µ. Certaines portions de la paroi, parmi les plus différenciées, peuvent émettre des digitations intracytoplasmiques (pl. 14, fig. a) qui sont perforées par des plasmodesmes (pl. 14, fig. b). On peut estimer que la surface occupée par les zones à plasmodesmes représente le 1/4 de la surface totale développée des cellules albumineuses, tenant compte de l'espace occupé par les expansions pariétales, que l'on peut apprécier par le calcul.

La densité des pores au sein des différenciations de la paroi où ils sont regroupés est de 2 à 2,5 X $10^9$ pores/cm2 (pl. 14, fig. d) le nombre des pores pouvant atteindre 4 à 500 dans chacune des expansions pariétales les plus importantes. Dans les cellules chlorophylliennes, le groupement des plasmodesmes s'effectue au niveau des zones ponctuées primaires, donc dans des portions amincies de la paroi (pl. 12, fig. a). Les tubules y sont disposés parallèlement les uns aux autres et perpendiculairement à la paroi. Ils apparaissent continus d'un bord à l'autre et leur longueur peut atteindre 1 µ. Parfois aussi, la portion de paroi contenant les plasmodesmes est épaissie et les tubules fortement digités y constituent un ensemble complexe (pl. 12, fig. b). De telles expansions pariétales sont la règle dans les cellules médianes. La longueur du tubule est alors celle de l'épaississement ; elle est habituellement de 3 µ mais

peut atteindre 5 µ dans certains cas.

A proximité des expansions pariétales traversées de plasmodesmes, on peut observer des accumulations de mitochondries (pl. 15, fig. a), cette association suggérant entre les deux types de structure des rapports fonctionnels.

Chaque zone ponctuée est bordée sur toute sa longueur par une nappe de reticulum endoplasmique qui lui est étroitement appliquée, et dont elle n'est séparée que par une très mince couche de hyaloplasme (pl. 15, fig. c). Au niveau de chaque pore plasmodesmique le reticulum endoplasmique émet un diverticule très fin qui s'engage dans le plasmodesme au sein duquel il constituera le desmotubule (pl. 15, fig. f et pl. 16). Autour de chaque diverticule, le plasmalemme s'invagine également et lui constitue une gaine d'aspect godronné ; entre les deux est intercalée une mince lame de cytoplasme. Cet ensemble traverse ainsi l'espace périplasmique, important et garni d'émergences fibreuses, jusqu'à la paroi, à travers un manchon de callose qui peut être commun à plusieurs plasmodesmes voisins (pl. 15, fig. b et c).

Le tubule plasmodesmique traverse la paroi jusqu'à l'espace interpariétal, qui s'apparente au nodule médian des cribles mais est d'un calibre plus réduit, de la même façon que les perforations plasmodesmiques sont d'un diamètre très inférieur à celui des pores criblés.

Cet espace peut être constitué par la juxtaposition de cavités qui se creusent progressivement dans la lamelle moyenne. Ces cavités peuvent aussi fusionner, donnant ainsi naissance à un véritable canal plus ou moins cylindrique qui pénètre dans les parties adjacentes de la paroi (pl. 13, fig. a). Le diamètre du canal est compris entre 150 et 200 nm, les cavités individuelles peuvent atteindre 400 nm. Le nodule médian des cribles a une épaisseur de 350 à 600 nm (pl. 13, fig. b).

A la périphérie des différenciations pariétales plus élaborées garnies de plasmodesmes digités, chaque tubule est entouré par un "espace périplasmique" comparable à celui présent en surface et contenant, comme lui, des microfibrilles (pl. 16). Ceci semble indiquer que le plasmalemme inclus n'est peut-être pas étranger, lui non plus, à l'accroissement en épaisseur de la paroi dans les zones considérées. Le manchon de callose entourant le tubule hors de la paroi est en continuité avec cet espace ménagé autour du plasmodesme.

Il n'y a pas constriction du plasmalemme au niveau du pore. Entre la membrane plasmique et la paroi, le plasmodesme paraît circulaire en section transversale (pl. 15, fig. a). Il a alors un diamètre d'environ 40 nm, soit 8 nm de rayon pour le plasmalemme, 11,5 nm de diamètre pour le manchon cytoplasmique et 8,5 nm de rayon pour le desmotubule émis par le reticulum. Le manchon de callose dans lequel est inclus l'ensemble a un diamètre de 100 nm soit 30 nm de rayon autour du tubule plasmodesmique. En pénétrant dans la paroi, le plasmodesme s'évase légèrement (60 nm) mais conserve une forme grossièrement cylindrique, bien qu'irrégulière et contournée.

Le desmotubule central peut alors revêtir deux aspects différents pouvant coexister dans l'espace au sein du même plasmodesme (pl. 16). Ou bien il se maintient à distance (10 nm) du plasmalemme en subissant une légère augmentation diamétrale (20 nm). En section, il apparaît alors constitué de sous-unités denses aux électrons de 6 nm environ de diamètre (pl. 15, fig. d). Ou bien il s'évase largement (50 nm) et vient s'appliquer contre le plasmalemme dont il n'est plus séparé que par un espace restreint (6-8 nm). Dans ce dernier cas il paraît avoir un contenu homogène beaucoup plus chromophile que le saccule de reticulum dont il est issu (pl. 15, fig. e et pl. 16). Le calibre du tubule plasmodesmique augmente légèrement (75 nm) dans les couches plus profondes de la paroi.

Les plasmalemmes paraissent en continuité d'un bord à l'autre de la paroi, même dans les tubules les plus fortement digités. Dans le cas du desmotubule, nombre d'images suggèrent qu'il n'y a pas interruption de l'interface limitante ; il n'est cependant pas possible d'affirmer que les éléments du reticulum de deux cellules voisines sont en communication directe par l'intermédiaire de la partie centrale du plasmodesme. Sans doute d'ailleurs les systèmes membranaires constitutifs du tubule subissent-ils des modifications en pénétrant dans la paroi. Ainsi, sur coupes contrastées à l'uranyle/plomb, le plasmalemme limitant le desmotubule est beaucoup moins dense aux électrons qu'à la périphérie cellulaire, sans qu'il y ait cependant une différence entre sa face interne et sa face externe (pl. 16). Il n'est pas sûr non plus que le desmotubule soit limité par une membrane analogue à celle du reticulum. Enfin, le "cytoplasme" contenu dans le tubule est plus chromophile que le cytoplasme de la cellule.

### 3.5.- CELLULES DE STRASBURGER DE LA BASE DE L'AIGUILLE.

On n'observe pas à la base de l'aiguille une différenciation infrastructurale entre plusieurs types cellulaires aussi poussée que dans les parties supérieures. Les cellules albumineuses ont un aspect plus régulier et arrondi et perdent leurs ornementations caractéristiques : on ne discerne plus nettement, de zones plasmodesmiques très développées (pl. 17, fig. a). On distingue cependant des cellules à nombreux chloroplastes très allongés dont le système lamellaire est développé (pl. 17, fig. b) et des cellules qui en sont dépourvues. Dans ces dernières, qui présentent des aspects de dégénérescence variés (évolutifs ?), on observe d'une part des plastes non chlorophylliens, d'autre part diverses figures d'autolyse (pl. 17, fig. c). Dans tous les cas, le cytoplasme est très dense et contient de nombreuses gouttelettes lipidiques (pl. 17, fig. a). La distribution des types cellulaires (chlorophylliens ou non) n'est pas aussi rigoureuse que dans les parties supérieures de l'aiguille.

### 3.6.- CELLULES DU PARENCHYME VERTICAL DU PHLOEME.

Un examen rapide des cellules des "rayons" du phloème -cellules de parenchyme vertical intercalées entre les éléments criblés- montre qu'elles présentent, lorsqu'elles sont fonctionnelles, des aspects cytologiques comparables à ceux des cellules de STRASBURGER.

Les cellules ont une paroi mince comparable à celle des cellules albumineuses et sont en relation par l'intermédiaire de zones plasmodesmiques épaissies (pl. 18, fig. b). Les communications avec l'élément criblé s'établissent par l'intermédiaire de structures mixtes, mi-plaque criblée, mi-zone ponctuée épaissie (pl. 13, fig. d et pl. 18, fig. a). A la différence des éléments criblés (pl. 18, fig. a) elles ne contiennent pas de protéine P.

Autour du noyau central très volumineux le cytoplasme renferme de nombreux polyribosomes et de petites vacuoles éparses (pl. 18, fig. c). Le reticulum endoplasmique rugueux est bien développé à la périphérie. Les corps de Golgi ne paraissent plus fonctionnels dans l'aiguille adulte (absence de vésicules golgiennes). Enfin la trame hyaloplasmique est très dense. Les plastes sont peu nombreux ; ils ne sont jamais chlorophylliens.

Comme dans les cellules de STRASBURGER latérales, la densité cytoplasmique de ces cellules est variable (pl. 18, fig. b et c) et peut être en rapport avec leur degré de vitalité et leur participation à la conduction dans l'élément criblé.

Les cellules des rayons du phloème présentent donc, sur le plan cytologique, de fortes analogies avec les cellules albumineuses des flancs et on ne peut, au vu de leurs aspects infrastructuraux, les en distinguer nettement. Il faut noter cependant l'absence complète de chloroplastes.

### 3.7.- CELLULES DE STRASBURGER DU RAMEAU COURT.

L'étude des cellules albumineuses dans la structure de tige ne constitue pas le but premier de notre travail. Nous avons effectué cependant, à leur sujet, quelques observations succinctes pour essayer d'établir des analogies infrastructurales entre les cellules de l'aiguille et celles de la tige. Dans les cellules "albumineuses" du système vertical (pl. 19, fig. a), comme dans les cellules marginales des rayons (pl. 19, fig. b, c et d) on retrouve des aspects très comparables à ceux décrits dans l'aiguille. Certaines cellules verticales sont analogues à ces cellules "médianes" évoluées : présence de plastes denses arrondis non chlorophylliens, ribosomes regroupés et peu nombreux, trame hyaloplasmique bien visible, nombreuses petites vacuoles éparses. Dans les cellules marginales des rayons que nous avons observées, les plastes sont intermédiaires entre les chloroplastes des cellules chlorophylliennes et les plastes alamellaires des cellules médianes : ils sont amylifères mais possèdent des thylacoïdes rudimentaires et surtout un reticulum périphérique très développé (pl. 19, fig. b). Outre la présence de fibres cytoplasmiques et de formation cytoplasmique denses (pl. 19, fig. c et d) il faut signaler la présence de nombreux polyribosomes et de nombreuses petites vacuoles transparentes aux électrons. Entre cellules des rayons voisins, les plasmodesmes sont regroupés dans des épaississements pariétaux (pl. 19, fig. c), moins différenciés cependant que dans les cellules de STRASBURGER de l'aiguille.

On peut donc là encore établir une comparaison entre les cellules de l'aiguille et celles du tronc. Les variations observées sont peut être liées à l'âge des cellules étudiées - notre étude est superficielle et n'en fournit qu'un "instantané" d'un stade déterminé de leur évolution. Tout porte à croire cependant que l'on peut établir un parallèle étroit entre les divers systèmes parenchymateux. La possession de zones plasmodesmiques épaissies différenciées reste cependant l'apanage des cellules foliaires.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

## CHAPITRE IV - ETUDE CYTOCHIMIQUE DES CELLULES DE STRASBURGER ADULTES

### 4.1. - ETUDE DE LA PAROI.

L'étude infrastructurale des cellules de STRASBURGER a montré que les cellules médianes présentent sur le plan cytologique de fortes analogies avec l'élément criblé en cours de maturation. Ces analogies permettent de supposer que le tissu de transfert est concerné par la conduction latérale des produits du métabolisme photosynthétique. Quand on sait le rôle joué par les parois dans le phénomène de translocation, il paraît logique d'en préciser les caractéristiques.

Un certain nombre d'indications sur la nature des constituants pariétaux et leur agencement dans la paroi sont fournies au microscope normal, par des colorations dont on connait bien la signification cytochimique. L'observation en fluorescence peut se révéler indispensable pour localiser certains constituants. L'étude de la structure fine de la paroi est cependant du domaine du microscope électronique. Diverses techniques permettent de préciser les rapports structuraux entre les constituants amorphes ou fibrillaires de la paroi.

#### 4.1.1. Microscopie photonique

##### 4.1.1.1. Observations au microscope normal

Au bout de 10 minutes de colorations par le bleu de toluidine à pH 4.5, la paroi des cellules de STRASBURGER se colore en rouge pourpre (Pl. 20, a). Cette coloration métachromatique (métachromasie β ) peut être conservée sur coupes montées dans un milieu hydrophobe, après traitement des lames au molybdate d'ammonium et déshydratation au butanol tertiaire (177). Mais elle vire alors au violacé et se distingue moins nettement de la coloration orthochromatique bleue des parois lignifiées (Pl. 20, b). On obtient également une coloration métachromatique de la lamelle moyenne des tubes criblés. Les coupes à la paraffine provenant de blocs fixés de divers manières donnent des résultats très reproductibles et comparables. Avec des tissus frais, les résultats sont moins constants (interférence avec les protéines cellulaires ?).

Le rouge de ruthénium colore intensément la lamelle moyenne et les angles intercellulaires des cellules albumineuses (Pl. 20, d). La coloration obtenue avec le bleu astra est très intense et semble avoir une localisation moins précise. Le colorant n'a cependant aucune action sur la paroi des tubes criblés et donc peu d'affinité pour la cellulose. L'hydroxylamine ferrique communique aux cellules de transfert une coloration brun-rougeâtre, que l'on observe également dans les lamelles moyennes du phloème. Les autres parois cellulaires ne se colorent pas.

##### 4.1.1.2. Observations au microscope à fluorescence

a) Mise en évidence de la callose

La recherche de la callose nécessite l'emploi de techniques appropriées si l'on veut pouvoir affirmer sa présence avec certitude. La coloration en fond clair par le bleu de résorcinol (83) fournit de très bons résultats au niveau des cribles, où la callose est abondante. Elle est inopérante dans le cas des cellules albumineuses. L'observation en fluorescence UV de coupes de tissu frais fluorochromées par le bleu d'aniline constitue une méthode beaucoup plus sensible.

Grâce à cette technique, on constate que la callose tapisse intérieurement les cellules albumineuses sous forme d'un film très mince au sein duquel elle est localement plus concentrée sous forme de fins granules plus visibles (Pl. 22, a). Ce revêtement interne continu s'épaissit fortement au niveau des zones à plasmodesmes (Pl. 20). En section, les portions épaissies (Pl. 22, c et e) ou amincies (Pl. 22, b) de la paroi correspondant à ces zones sont délimitées de part et d'autre par deux bandes claires entre lesquelles s'intercale la paroi sombre dépourvue de callose. A chaque pore correspond une accumulation locale de callose, ce qui donne aux expansions pariétales vues à plat un aspect pointillé (Pl. 22, d). Cependant la callose est beaucoup moins abondante dans ces zones qu'au niveau des cribles (Pl. 22, f).

Les cellules de STRASBURGER sont en relation avec le chlorenchyme périphérique par une succession de zones à plasmodesmes. Au niveau de tous ces points de passage, on note la présence de très faibles quantités de callose. Celle-ci est donc présente au niveau de toutes les communications plasmodesmiques de l'aiguille.

b) Autofluorescence

Si l'on examine des coupes de tissus frais dans des solutions tamponnées de pH variés,on constate que la paroi des cellules de STRASBURGER présente, en lumière bleue (400 nm) une autofluorescence vert émeraude dont l'apparition et l'intensité dépendent du pH des solutions utilisées. La coloration verte ne se manifeste qu'à partir de pH 8 et son intensité croît jusqu'à pH 10, point au-delà duquel elle persiste sans se modifier. Cette autofluorescence est caractéristique des cellules de STRASBURGER et de la lamelle moyenne des éléments criblés. Dans les mêmes conditions les autres parois cellulaires présentent une fluorescence blanchâtre très différente (Pl. 20, f).

Le fait que cette coloration est pH- dépendante paraît en rapport avec une électropolarité particulière de la paroi des cellules albumineuses, non observée chez les autres types cellulaires.

Ces observations suggèrent que la paroi des cellules de STRASBURGER est essentiellement constituée d'hémicelluloses et de pectines ; ces dernières sont plus abondantes dans la lamelle moyenne et aux angles des cellules ; une partie seulement des groupements carboxyles des acides pectiques est estérifiée. La paroi est en outre entièrement revêtue de callose, avec une concentration particulière autour des pores plasmodesmiques. La paroi des éléments criblés est très différente : elle est presque uniquement constituée de cellulose ; les lamelles moyennes diffuses du phloème sont par contre de nature pectique.

4.1.2. Microscopie électronique

4.1.2.1. Aspect des coupes non contrastées

L'examen de coupes non contrastées fournit certaines indications quant à l'agencement interne des parois des cellules albumineuses. La lamelle moyenne, épaisse, apparaît claire après fixation aldéhydique non osmiée (Pl. 21, a) mais présente, après postfixation, une certaine osmiophilie (Pl. 21, b). Dans les deux cas, les points de jonction triangulaires entre cellules sont plus denses. Contre la lamelle moyenne la plus grande partie de la paroi est moyennement contrastée ; on y discerne des strates plus sombres disposées parallèlement. Enfin, à la périphérie,contre l'espace périplasmique,on discerne une zone claire d'épaisseur variable.Ces observations conduisent donc à admettre, en première approximation l'existence d'une structure tripartite de la paroi, ses différentes couches variant par leur aspect amorphe ou ordonné et leur densité aux

électrons en particulier si les objets n'ont pas subi de postfixation. Ceci suggère un agencement et, peut-être, une composition chimique différente.

4.1.2.2. Emploi des contrastants. Réaction de précipitation

Les contrastants habituels fournissent peu d'informations complémentaires à cette première image. Le traitement des coupes au protéinate d'argent communique aux différents constituants de la paroi une coloration très uniforme. On distingue cependant à la périphérie de la paroi, contre le plasmodesme des zones plus chromophiles, discontinues, surtout nombreuses dans les cellules chlorophylliennes dont la paroi est la plus épaisse (Pl. 21, d). On peut discerner en outre que les parois colorées par cette technique ont une structure fine hétérogène et un aspect granuleux. On retrouve ces derniers aspects après contraste à l'uranyle/plomb. Ils ne paraissent donc pas liés à l'emploi du protéinate d'argent qui produit des colorations dont la finesse est limitée par la taille des grains d'argent produits. L'acétate d'uranyle et le citrate de plomb réagissent très fortement avec la lamelle moyenne, qui devient très dense aux électrons (Pl. 21, c). La position et l'épaisseur de cette lamelle moyenne, ainsi nettement délimitée, correspondent étroitement à ce que l'on observe sur coupes non contrastées.

La paroi des cellules de STRASBURGER a donc une structure très différente de celle de l'élément criblé, plus épaisse et constituée par la juxtaposition étroite de nombreuses microfibrilles cellulosiques au sein d'une matrice amorphe (Pl. 12, c), structure déterminant l'aspect nacré caractéristique en microscopie photonique.

On pouvait espérer que les techniques de coloration au bleu alcian ou au rouge de ruthénium fourniraient des informations sur la distribution des groupements acides libres liés aux pectines. En fait il n'en est rien. La formation de complexes colorés très visibles en fond clair n'entraine pas d'augmentation appréciable de la densité électronique, sauf dans certains cas (tissu albumineux primaire) où la teneur en pectines est particulièrement élevée.

La détection de pectines estérifiées par formation d'hydroxamates ferriques constitue par contre une méthode satisfaisante. Des divers essais effectués, il ressort que l'on obtient les meilleurs résultats en effectuant la réaction non pas sur des blocs préfixés au glutaraldéhyde mais sur des coupes ultrafines recueillies sur grilles en or. Dans ce cas, à la variante de BORNMAN et col. (33), il faut préférer celle de JUNIPER et col. (155) qui utilise des réactifs plus dilués.

La méthode ne donne pas des résultats irréprochables quant à la qualité des images mais permet d'apprécier la répartition des pectines estérifiées dans la paroi. Dans les zones à plasmodesmes les pectines sont exclusivement localisées dans la lamelle moyenne sensu stricto, même quand la paroi subit ultérieurement un accroissement diamétral important à ce niveau. Dans le reste des parois, elles ont par contre une répartition plus large avec une concentration locale au niveau de la lamelle moyenne. Les parties périphériques claires aux électrons en sont dépourvues (Pl. 22, g).

La callose n'est pas contrastée sur coupes fines après coloration à l'uranyle/plomb ou au protéinate d'argent. Elle apparaît transparente aux électrons et sa localisation ne peut donc être qu'inférentielle. Elle constitue autour de la partie externe des plasmodesmes un manchon circulaire plus ou moins anastomosé à celui des tubules voisins.

Les techniques de digestions chimique et enzymatique permettent de préciser avec plus de rigueur la répartition des différents constituants de la paroi, et d'en apprécier les modalités d'association. Les images fournies par ces deux types de techniques sont cependant bien différentes.

4.1.2.3. Extractions chimiques des parois.

L'extraction ménagée par l'E.D.T.A. ou les solutions alcalines permet de distinguer plusieurs niveaux dans la paroi différant par leur teneur en pectines, en hémicelluloses et en cellulose . Un traitement d'une heure par la solution de chélateur ne provoque pas de modifications notables (Pl. 10,a) mais au bout de 24 h, la lamelle moyenne a entièrement disparu (Pl. 10, b). Après incubation dans la soude diluée, on observe en outre un éclaircissement progressif de la partie périphérique des parois située contre le plasmalemme et la partie médiane. Dans cette dernière, on peut reconnaître en outre la présence de microfibrilles cellulosiques. Lorsque le traitement n'est pas trop prolongé, il persiste également une zone mince, très dense, d'épaisseur constante, dans une paroi par ailleurs très attaquée.

Le mécanisme d'action de l'EDTA et de l'oxalate d'ammonium est bien connu. Les produits agissent par déméthylation des pectines et rupture des enchaînements d'acide glucuronique qui les constituent. La solubilisation des hémicelluloses dans la solution diluée de soude, à froid, s'effectue progressivement et l'on peut penser que les stades observés correspondent d'une part à un degré de polymérisation plus ou moins grand des hémicelluloses, d'autres part à leur accessibilité dans la paroi.

4.1.2.4. Extraction enzymatique des parois

Quelle que soit l'enzyme utilisée, la digestion enzymatique amène assez rapidement la désagrégation complète de la structure pariétale non sans fournir au passage bon nombre d'échelons intermédiaires qui permettent de préjuger de son agencement initial. La rapidité d'action des enzymes est bien entendu considérablement accrue si l'on opère au pH d'activité optimale, qui selon l'enzyme utilisée se situe entre 4 et 5,5. De la même façon, les hémicellulases et la cellulase sont plus actives à des températures élevées , alors que la pectinase a un rendement maximum à 25°C. Pour suivre progressivement les stades de désorganisation de la paroi, il est souhaitable d'opérer en solutions tamponnées à la neutralité ; l'enzyme agit plus lentement, et à température ambiante, ce qui supprime les artéfacts dus à la dissolution non enzymatique de constituants pariétaux dans des solutions aqueuses chaudes. Dans la pratique, les meilleurs résultats sont obtenus en incubant les échantillons dans les solutions enzymatiques pendant 6 à 72 h, délai au bout duquel les parois ont en général entièrement disparu.

C'est au niveau des zones à plasmodesmes, amincies ou épaissies, que se manifestent les premiers signes de désagrégation de la paroi (Pl. 8 , a, b, c). La partie périphérique de ces zones disparaît tout d'abord laissant persister un noyau central plus résistant, correspondant à la lamelle moyenne. Les parties attaquées ne contiennent pas de microfibrilles. Le reste de la paroi s'éclaircit ensuite progressivement, non d'une façon centripète qui pourrait correspondre à la pénétration de l'enzyme, mais selon des modalités bien définies sans doute en rapport avec une plus grande fragilité des parties de la paroi les premières détruites. C'est ainsi que se dégage tout d'abord la partie centrale d'une part (Pl. 9, a) et les parties les plus périphériques d'autre part (Pl. 9, b). L'élimination progressive des constituants laisse apparaître au niveau de la lamelle moyenne sensu stricto une phase amorphe constituée de structures punctiformes assemblées en un réseau dont la densité est très variable (Pl. 9, a). Plus à l'exté-

rieur apparaissent des fibrilles disposées en faisceaux parallèles assez lâches et emballées dans un feutrage d'éléments plus courts (Pl. 8, e). Contre le plasmalemme au contraire, l'attaque enzymatique met rapidement à jour un réseau peu dense de filaments courts disposés de façon assez anarchique (Pl. 9, b).

Entre ces deux parties de la paroi très sensibles à l'attaque enzymatique persiste longuement une zone mince d'épaisseur uniforme, fortement colorée, et dans laquelle aucune structure n'est discernable (Pl. 9, e). Si l'on prolonge encore la durée d'incubation, cette partie résistante elle-même disparaît, sans laisser apparaître de microfibrilles et la paroi n'a plus alors de contenu structuré (Pl. 9, f). Seuls quelques noyaux de substance chromophile restent adhérents au plasmalemme qui est encore très fortement réactif. Les parties de la paroi contenant des plasmodesmes sont toujours plus sensibles à la dégradation enzymatique que celles qui en sont dépourvues (Pl. 8, d).

La dissociation enzymatique des éléments constitutifs de la paroi permet donc de dégager d'une matrice amorphe des strates microfibrillaires disposées parallèlement dans sa partie médiane.

4.1.3. Conclusions.

L'ensemble des observations réalisées à l'aide des techniques ci-dessus permet de préciser l'agencement des divers constituants au sein de la paroi des cellules de transfert, et leur teneur relative.

La paroi des cellules de STRASBURGER est essentiellement constituée d'une matrice amorphe parcourue dans sa partie moyenne, de strates microfibrillaires cellulosiques peu denses. Les zones à plasmodesmes sont presque exclusivement constituées d'hémicelluloses, les composés pectiques n'apparaissant qu'aux endroits où la lyse de la lamelle moyenne (produisant le canal central) n'a pas été complète. Dans le reste de la paroi les pectines ont une concentration décroissante,de la lamelle moyenne vers la périphérie où elles sont absentes. Il n'existe de microfibrilles de cellulose que dans la partie médiane de la paroi.

L'examen comparatif des divers types cellulaires fournit des indications quant à la chronologie des différents dépôts de substances pariétales. Les cellules internes meurent généralement lorsque l'aiguille a terminé sa croissance ; elles sont donc limitées par une paroi primaire, qui possède une lamelle moyenne diffuse, des microfibrilles pluristratifiées au sein d'une matrice amorphe, et une zone périphérique résistant à l'extraction enzymatique ; mais elle est toujours dépourvue d'apports périphériques supplémentaires hémicellulosiques produits par l'activité secondaire du plasmalemme. On observe au contraire ces épaississements secondaires dans les cellules médianes et les cellules chlorophylliennes vivantes ; ils constituent la plus grande part des expansions plasmodesmiques et correspondent vraisemblablement aux "zones chromophiles" visibles après coloration au protéinate d'argent.

La plus grande partie de la paroi est donc d'origine primaire. Elle est pauvre en cellulose, qui apparaît sous forme de strates peu denses disposées dans sa partie médiane et ce caractère la distingue nettement de la paroi criblée. La lamelle moyenne intercellulaire est épaisse et riche en pectines. A la fin de la phase d'accroissement cellulaire, les matériaux constitutifs de la paroi se déposent en une masse compacte non fibrillaire et d'épaisseur constante. Dans les cellules qui restent ensuite fonctionnelles, la paroi continue à s'accroître en épaisseur, cet accroissement étant lié à une activité importante du plasmalemme. Ces apports se font sous la forme d'un feutrage lâche d'hémicelluloses et sont surtout abondants à des niveaux privilégiés de la paroi (zones à plasmodesmes des cellules médianes par exemple).

## 4.2.- ETUDE DES LIPIDES.

### 4.2.1. Localisation intracellulaire des lipides neutres dans les cellules de STRASBURGER

La localisation intracytoplasmique des gouttelettes de lipides neutres ne présente pas, on l'a vu, de difficultés particulières et les résultats obtenus sur coupes de tissus frais ou fixés au formol-calcium, colorées au noir soudan B, et sur coupes de tissus fixés au formol-osmium et inclus dans les polyéthylène-glycols sont concordants. Les cellules albumineuses contiennent une grande quantité d'inclusions lipidiques, essentiellement des triglycérides ; les stérides ne sont pas décelables.

Dans les cellules chlorophylliennes, une grosse goutte est placée en position centrale, contre le noyau ; les autres inclusions grasses, beaucoup plus petites, sont dispersées dans la masse cytoplasmique (Pl. 26). Dans les cellules médianes, la disposition des lipides est différente. Les gouttes sont de taille moyenne et réparties de façon assez uniforme dans toutes les cellules. On observe donc une spécialisation interne au sein des cellules de STRASBURGER sensu-stricto ; certaines cellules sont particulièrement orientées vers la synthèse de lipides, qui peuvent constituer des accumulations très importantes. Quant aux cellules internes, la mince couche de cytoplasme pariétal est entièrement remplie sur toute sa longueur de gouttelettes d'aspect uniforme.

La réaction nadi permet de mettre en évidence dans les tissus de l'aiguille, d'une part des inclusions lipidiques fortement insaturées qui se colorent en lilas, d'autre part des gouttelettes pourvues en doubles liaisons qui prennent une teinte bleu-noire (épiderme) (Pl. 27, c).

Nos observations sur la localisation intracellulaire des lipides nous ont amené à préciser les deux points suivants :

- présence de lipides intravacuolaires ;
- action des "fixateurs" sur les lipides insaturés.

#### 4.2.1.1. Présence de lipides intravacuolaires

On admet habituellement qu'au sein des cellules végétales, les gouttelettes huileuses sont exclusivement localisées dans le cytoplasme. Nous avons constaté qu'il existe des inclusions lipidiques très fines dans le vacuome des cellules tannifères : elles apparaissent comme une émulsion dispersée dans la phase aqueuse colloïdale du vacuome. Ces gouttelettes très fines sont particulièrement visibles après fluorochromisation par le 3,4-benzopyrène (Pl. 27, f). Nous ne pensons pas que la présence de lipides vacuolaires soit liée à la synthèse de polyphénols par les cellules, mais qu'elle constitue en réalité un phénomène plus général. Diverses observations antérieures font état de la présence d'inclusions lipidiques à l'intérieur des vacuoles (40, 216). Si on ne les a pas observées plus souvent, c'est en raison de la non conservation du vacuome sur les coupes de tissus frais habituellement étudiées. Après fixation au formaldéhyde au contraire, il s'établit entre le fixateur et les polyphénols des liaisons très rigides et les lipides contenus dans le vacuome se trouvent "emprisonnés" dans la masse très compacte ainsi formée. Dans les vacuoles non tannifères, de telles liaisons ne peuvent s'établir et il est probable que la phase aqueuse du vacuome est toujours dissoute , ainsi que les gouttelettes lipidiques qu'il renferme. Il n'y a pas en effet de raison particulière de penser que dans les cellules à vacuome "clair" (et c'est le cas des cellules albumineuses) il n'y a pas de lipides intravacuolaires.

#### 4.2.1.2. Action des préfixations aldéhydiques sur les lipides insaturés.

Au début de notre travail, nous avons surtout étudié la localisation intracellulaire des lipides neutres sur coupes de tissus fixés au formaldéhyde à pH 7 ou au formol-calcium de BAKER. Ce mode de fixation, même prolongé, est réputé sans action sur les inclusions lipidiques, dont ni la morphologie ni la réactivité ne seraient modifiées. En fait il n'en est rien. Si l'on contrôle la fixation au formaldéhyde sous le microscope, on constate que les gouttelettes huileuses d'abord incolores et régulièrement sphériques, prennent progressivement une teinte jaunâtre puis jaune franc. En même temps elles perdent leur forme originale, se creusent et finalement disparaissent en partie (Pl. 27, b). La quantité totale de lipides décelée sur coupes histologiques diminue ainsi sensiblement après une fixation prolongée au formol.

Etant donné la teneur élevée en acides gras insaturés des triglycérides des aiguilles, nous avons pensé tout d'abord qu'intervenait uniquement une oxydation banale amenant la production d'aldéhydes puis de peroxydes, selon le processus utilisé dans la réaction nadi. On peut supprimer le contact avec l'oxygène en utilisant un fixateur préparé avec de l'eau distillée longuement bouillie additionnée par exemple de rongalite. En effet, l'addition de réducteurs au mélange fixateur fournit de bons résultats sur des tissus riches en acides insaturés: glandes surrénales (143).

Le processus d'altération des gouttelettes lipidiques n'est cependant pas arrêté si l'on supprime toute possibilité d'oxydation. On constate par ailleurs que ce processus n'intervient pas, ou beaucoup plus lentement, si l'on préfixe des tissus avec du glutaraldéhyde ou de l'hydroxyadépaldéhyde (Pl. 27, a). Au bout de délais de fixation assez longs, la couleur et la forme des inclusions lipidiques ne sont pas modifiées. Nous avons donc pensé à une action directe du formaldéhyde sur les doubles liaisons des acides gras insaturés sans pouvoir en expliquer le mécanisme.

### 4.2.2. Localisation intracellulaire de phospholipides

La technique à l'hématéine acide de BAKER permet de constater que les phospholipides cellulaires sont essentiellement liés à des structures membranaires. On observe en particulier une coloration très intense (Pl. 26, d) des mitochondries et des plastes. Les plastes denses des cellules médianes apparaissent comme autant de structures sphériques vivement colorées, et ces aspects nous avaient conduit , tout d'abord, à les assimiler à des gouttelettes de phospholipides libres. La membrane plasmique réagit le plus souvent de façon positive, mais le résultat n'est pas constant. La coloration est quelque peu affaiblie sur les coupes obtenues après inclusion dans les polyéthylèneglycols même, par rapport aux coupes à congélation réalisées au cryostat.

### 4.2.3. Discussion

#### 4.2.3.1. Mise en évidence intracellulaire des lipides des tissus végétaux

Les méthodes de localisation globales des esters d'acides gras et de phospholipides (72) dans les cellules animales font partie actuellement de la technique histochimique courante. On peut aisément mettre en évidence sur coupes de tissus frais ou fixés la masse des lipides neutres, ou les phospholipides structuraux, ou bien simultanément les deux types de composés (35). Les méthodes utilisées pour caractériser les lipides phosphorés ont une sensibilité et une spécificité limitées mais offrent pour le travail courant des

garanties suffisantes (3, 34, 60, 133). Une réaction positive est fournie avec l'hématéine par les lipides contenant des doubles liaisons dans la même molécule que la portion phosphatée.

Si le nombre de travaux portant sur les inclusions grasses est très élevé, cela est dû en partie aux investigations anatomo-pathologiques dans lesquelles les désordres organiques se manifestent par l'apparition de lipidoses localisées ou généralisées (131). Par comparaison, on peut être étonné du petit nombre de travaux concernant la localisation dans les cellules végétales des lipides neutres (254) ou masqués (98, 255).

Si l'on désire cependant effectuer une étude rigoureuse de la localisation des lipides cellulaires libres et de ceux combinés à des protéines, on constate que se posent avec acuité le problème de leur maintien in situ, donc de leur fixation, et celui de leur mise en évidence microscopique à l'aide de techniques aboutissant, par des moyens divers, à la formation d'un produit coloré.

1. Préparation de tissus pour la recherche des lipides

On peut envisager de localiser les lipides intracellulaires sur des coupes de tissus frais, sans aucun prétraitement, ou sur coupes provenant de blocs préfixés de diverses manières.

a) l'emploi de coupes cryostatées est rendu nécessaire pour l'étude, dans les tissus animaux, de produits fragiles (plasmalogène) que l'on désire étudier à l'état natif, soit par observation directe, soit par histochromatographie combinée. Les travaux de HACK et HELMY (115) constituent en ce sens une voie d'investigation particulièrement intéressante. L'histochromatographie sur papier ou couche mince paraît constituer une technique directement applicable aux tissus végétaux frais, sans les refroidir, évitant ainsi certains effets dénaturants.

L'observation microscopique de coupes de tissus frais conduit cependant à de graves erreurs de localisation en raison des perturbations intracellulaires considérables apportées d'une part au moment de la réalisation des coupes, d'autre part, au stade de la coloration. Pour pallier cet inconvénient, certains auteurs ont envisagé de fixer énergiquement les coupes au sortir du cryostat dans des mélanges à base de sublimé (273-274). Mais les résultats ne paraissent guère concluants. Dans le cas de tissus végétaux, nous pensons que l'emploi de co de tissus frais, assez épaisses pour conserver des cellules intactes, n'est concevable que si on les colore ultérieurement dans des conditions non dénaturantes difficiles à réaliser.

b) l'emploi de tissus fixés paraît donc s'imposer dans la plupart des cas, ne serait-ce, comme le souligne JONES (X), que parce que le processus de fixation amène la formation, dans les structures lipidiques, de produits dérivés plus faciles à mettre en évidence. La préfixation des tissus est indispensable si l'on veut préserver les lipides intravacuolaires associés ou non à des polyphénols.

Le formaldéhyde a été longtemps d'un emploi généralisé, et son "innocuité" vis à vis des lipides intracellulaires n'a pas été mise en doute pendant de nombreuses années. Les auteurs signalent cependant, avec insistance, la formation de carbonyles qui résultent en fait de l'action, sur les doubles liaisons

---

(X) JONES D. Reaction of aldehydes with unsaturated fatty acids during histological fixation. 1972. Histochem. J., 4, 421-465.

éthyléniques, de l'oxygène dissous dans le fixateur et de l'oxygène atmosphérique (107, 157, 288). On peut aisément mettre en évidence les aldéhydes à l'aide du réactif de SCHIFF et ceci constitue une méthode simple pour apprécier le degré d'insaturation des gouttes lipidiques à un niveau considéré. Ces réactions d'autoxydation peuvent être supprimées par l'addition au mélange fixateur d'antioxydants énergiques (143).

L'amélioration des techniques chromatographiques a ensuite permis à divers auteurs de constater des "fuites" de phospholipides dans les tissus fixés au formaldéhyde. Au bout de périodes de fixations prolongées, ils observent la disparition, dans le milieu fixateur, de la totalité des phosphatidyl-éthanolamine, phosphatidyl-choline et phosphatidyl-sérine présentes dans le tissu frais*. Il se forme des acides gras, de l'acide phosphatidique et probablement de l'acide lysophosphatidique puis des composés phosphorés hydrosolubles. Cette incapacité de rétention de phospholipides membranaires par le formaldéhyde peut être améliorée par l'addition de sels de calcium (LEATHES in 21), ou mieux en ajoutant au fixateur du sel de REINECKE (61, 98). On arrive ainsi à supprimer en grande partie les pertes en lipides phosphorés.

Si ces faits sont bien connus, il ne semble pas qu'à l'heure actuelle, à notre connaissance, aucune publication histochimique fasse état de la diminution progressive des esters insaturés dans les tissus fixés au formaldéhyde, diminution qui peut aller jusqu'à leur disparition complète dans le cas de gouttelettes fortement insaturées.

Les observations que nous avons réalisées montrent que la diminution des inclusions grasses est la plus rapide et la plus importante dans le cas du parenchyme chlorophyllien. Les lipides du chlorenchyme sont fortement insaturés, comme on peut le vérifier par d'autres méthodes (aldéhyde/SCHIFF, nadi). Leur degré d'insaturation élevé va de pair, à notre avis, avec la présence à proximité immédiate de grandes quantités de leucoanthocyanes, qui constituent des antioxydants naturels très actifs (171, 172).

Nous avons montré que la disparition des inclusions lipidiques n'était aucunement en rapport avec une autoxydation . Elle persiste si l'on ajoute des réducteurs énergiques (rongalite) au milieu fixateur. Il ne nous a pas été possible de préciser davantage le phénomène, non décrit au moment où nous l'avons observé, et nous ne possédions pas les moyens d'investigation nécessaires pour en préciser le mécanisme.

Dans une série d'articles récents, JONES (152, 154) a expliqué clairement le mode d'action du formaldéhyde sur les doubles liaisons éthyléniques. Il a montré qu'il s'agit bien d'une action chimique directe indépendante de la présence d'oxygène dans le milieu.

La réaction est plus rapide avec les acides gras libres, mais se réalise également avec les esters. Elle est facilitée par une augmentation de température, mais intervient dans les conditions normales de fixation. Il se forme au cours de la fixation histologique par le formaldéhyde à froid ou à température ambiante des produits identiques à ceux obtenus in vitro à des concentrations et des températures élevées. Les réactions qui ont alors lieu modifient de façon significative le "facies acide gras" du matériel biologique. Au bout de 4 à 5 ans on peut ne plus observer de lipides dans les coupes de tissus conservés dans le formol: les acides gras insaturés donneraient d'abord des 1,3- glycols, puis subiraient une transformation irréversible en autres produits, dont beaucoup sont hydrosolubles ou hydrodispersibles dans le fixateur. Le phénomène est particulièrement clair et rapide lorsqu'il s'agit de tissux végétaux dont le degré d'insaturation est toujours élevé. Selon JONES,on obtient des résultats comparables avec l'acroléine.

---

* voir les références 73 et 126.

L'action du glutaraldéhyde n'est pas connue, en raison de la complexité prévisible des produits dérivés. On voit donc que l'observation microscopique de tissus frais présente de nombreux inconvénients. D'un autre côté, les méthodes de fixation classiquement utilisées ne sont nullement satisfaisantes. La préfixation des tissus est cependant hautement souhaitable, et il importe avant tout, dans les recherches de ce genre, de connaître avec précision le mode d'action du fixateur sur les structures lipidiques libres ou combinées que l'on souhaite mettre en évidence.

2. Méthodes de coloration des lipides intracellulaires

Nous avons passé en revue dans le chapitre "Méthodes" les différentes techniques utilisées pour mettre en évidence les lipides sur coupes fines de tissus frais ou préfixés au formaldéhyde. La maintenance in situ des inclusions "lipomorphes" ne peut être réalisée avec rigueur que si le solvant utilisé pour dissoudre le colorant n'a pas lui-même une action dissolvante ou dénaturante sur les lipides intracellulaires. D'autre part, la technique utilisée doit être suffisamment sensible pour déceler les gouttelettes les plus fines ou les lipides combinés à des structures membranaires.

a) Choix du solvant

La coloration par des lysochromes en solution dans l'éthanol, le butanol, le propylène glycol ou d'autres solvants organiques ne paraît pas constituer la méthode de choix pour l'étude précise des inclusions grasses. D'une part, en effet, les solvants exercent une action solubilisante vis à vis d'une partie au moins des gouttelettes intracellulaires. D'autre part les solutions alcooliques les plus souvent utilisées dénaturent plus ou moins les lipoprotéines, surtout si la coloration est réalisée sur des tissus frais.

Nous pensons que seules les techniques faisant appel à des colorants en solution aqueuse permettent de conserver la plus grande partie des lipides intracellulaires.

b) Choix du colorant

La nécessité d'employer des solutions aqueuses paraît exclure la plupart des colorants azoïques habituels, très hydrophobes. Il est possible de les faire passer en solution colloïdale (116) mais les colorations obtenues sont très peu intenses.

Les fluorochromes constituent selon nous la solution de choix, pour deux raisons :

- d'une part, ils sont hydrosolubles (thioflavine T, phosphine 3R) ou hydrodispersibles (hydrocarbures);
- d'autre part, l'observation en fluorescence permet de déceler de très faibles quantités de substances par l'effet de contraste qu'elle crée.

Les hydrocarbures constituent les meilleurs fluorochromes (89, 180). Parmi ceux-ci, les résultats les plus favorables sont obtenus avec le 3 ,4 - benzopyrène. Il est possible d'en réaliser des solutions aqueuses, à des dilutions extrêmement grandes, à l'aide de substances hydrotropes (caféine). Le 3 ,4 - benzopyrène produit des fluorescences très intenses au niveau des triglycérides mais également dans les lipoprotéines cellulaires (61, 98). La méthode est beaucoup plus sensible que les techniques d'investigation classique (soudan noir B) et l'on peut établir un parallèle avec les observations réalisées sur la callose.

La fluorescence produite après traitement au bleu d'aniline permet de localiser, dans la paroi des cellules de STRASBURGER, des quantités de callose extrêmement faibles, indécelables par les méthodes classiques au bleu de résorcinol.

Nous pensons que l'emploi de fluorochromes en solutions aqueuses permet,d'une part de réduire au minimum les erreurs dues à la dissolution partielle ou à la redistribution des inclusions lipidiques, d'autre part, par sa sensibilité, de mettre en évidence des quantités très faibles de lipides neutres ou phosphorés. Cela paraît pouvoir s'appliquer aux structures intracellulaires hydrophobes dépourvues de chaînes grasses.

4.2.3.2. Emploi des polyéthylèneglycols pour la localisation intracellulaire des esters d'acides gras insaturés

Introduction des polyéthylèneglycols en technique histochimique

Dès la mise sur le marché commercial des polyéthylèneglycols(= carbowaxes) de nombreux auteurs ont cherché à mettre à profit leurs propriétés technologiques pour les utiliser comme moyen d'inclusion destiné à l'observation, sur coupes fines, d'un certain nombre de constituants cellulaires non conservés, ou mal conservés, par les techniques habituelles d'inclusion à la paraffine.

Nous en avons rappelé au chapitre I certaines caractéristiques. Ces produits sont solubles dans l'eau et dans un grand nombre de solvants organiques. Toute une gamme de produits est actuellement disponible, différant entre eux par un degré de polymérisation qui leur confère une consistance à température ambiante qui s'étend du liquide à forte viscosité (PG 200 à 600) jusqu'au solide à très haute dureté (PG 4000 à 2000). Les échelons intermédiaires sont pâteux (PG 800) ou solides(PG 1000 ou 1540). L'emploi de ces composés pour la réalisation de coupes fines est intéressant à plusieurs points de vue :

- ces produits sont cristallins comme la paraffine et non pas amorphes ; les cristaux obtenus dans des conditions d'inclusion normales sont cependant très petits. Ces composés sont donc très durs et permettent, idéalement, la réalisation de coupes très fines.
- les polyéthylèneglycols sont entièrement hydrosolubles et miscibles avec l'eau en toute proportion : l'inclusion de blocs destinés à l'étude histochimique peut être réalisée en l'absence de tout solvant qui ferait disparaître des coupes les composés que l'on désire étudier.
- Tous ces produits sont très hygroscopiques : ils peuvent donc réaliser une déshydratation très efficace des blocs de tissus à étudier, qui subissent ainsi simultanément une déshydratation/inclusion.
- Les polymères solides et durs à température ambiante sont très fusibles et constituent des solutions claires à des températures très inférieures à celles qui conviennent pour l'inclusion à la paraffine: ainsi, le carbowax 1540 fond à 45° et il n'est pas besoin de souligner combien est néfaste pour l'étude histochimique, ou même en technique histologique, toute élévation de température. Outre les altérations morphologiques des tissus, l'échauffement exagéré produit toujours une appréciable perte de substance.
- Enfin, ces composés ont la réputation d'avoir un comportement totalement neutre vis à vis des lipides intracellulaires et c'est ce qui explique leur grande vogue, il y a quelques années, comme moyen d'investigation des lipides intracellulaires.

A ces avantages considérables s'opposent, il faut bien le dire, quelques inconvénients majeurs :

- l'hygroscopicité des carbowaxes, mise à profit pour déshydrater les tissus, est un inconvénient pratique pour la conservation et la manipulation des blocs : ceux-ci doivent être conservés au frais dans une enceinte close en présence de désséchant ; si l'on ne respecte pas ces précautions, les polyéthylèneglycols s'hydratent et deviennent inutilisables.
- Le bas point de fusion de ces composés impose de travailler à température réduite en évitant toute manoeuvre (manipulation manuelle prolongée...) susceptible de réduire la dureté du bloc, qui deviendrait rapidement impropre à la confection de coupes fines.
- l'inconvénient le plus important, celui qui a le plus freiné l'essor des polyéthylèneglycols et leur emploi en technique courante, réside dans la difficulté de manipuler les rubans de coupes et de les étaler. Si l'on place les rubans sur de l'eau pure, les coupes se désintègrent instantanément en raison de la trop grande affinité des PG pour l'eau et de la dispersion instantanée. Il y a là un problème technologique important auquel diverses solutions ont été apportées ; mais aucune n'est réellement satisfaisante.
- Un autre problème, lié au précédent, est la manipulation des rubans. Ceux-ci sont très fragiles, n'ont ni la rigidité, ni la cohésion des rubans de paraffine, doivent éviter tout contact avec l'eau ou la vapeur d'eau (instruments très secs).
- enfin, l'emploi des polyéthylèneglycols en histochimie des lipides ne constitue pas une panacée universelle comme on l'a cru tout d'abord : comme l'ont montré un certain nombre d'études, ces composés ne sont pas tout à fait inertes vis-à-vis des acides gras et de leurs esters présents dans les tissus vivants.

Cet ensemble de considérations démontre clairement que, à l'heure actuelle, les carbowaxes ne peuvent être utilisés comme milieu d'inclusion de routine, comme la paraffine. Leur emploi doit être réservé à certaines investigations particulières, pour lesquelles ils se révèlent indispensables, au prix de complications techniques indiscutables.

Depuis leur introduction en 1950 par BLANK et Mac CARTHY (32), les polyéthylèneglycols ou leurs dérivés ont été utilisés à de nombreuses reprises comme supports pour la réalisation de coupes de tissus fixés, à température ambiante (90, 127, 140, 153, 184, 190, 224, 230, 283) ou au cryostat (117), comme milieux d'inclusion pour la localisation intracellulaire des lipides neutres (92, 119, 219, 223, 241, 262, 300) ou d'activités enzymatiques (93, 95), à l'échelon optique ou infrastructural (247) et enfin pour la préparation de pièces destinées à l'étude autoradiographique (26, 132). Un certain nombre de travaux plus technologiques en ont précisé les conditions d'emploi (118). D'autres milieux hydrosolubles ont été proposés pour l'étude des lipides et des enzymes sur coupes fines (86, 87).

Dans les études relatives à l'observation intracellulaire des lipides sur coupes minces, la "neutralité" des polyéthylèneglycols vis à vis de ces composés a été assez tôt mise en doute. EDGREN et FREDRICSSON (74), puis TCHÁCAROF et POZÁLAKY (273, 274) ont montré que les carbowaxes exercent une action dissolvante vis à vis de certains acides gras libres (stéarique, laurique, oléique) et un effet dénaturant (regroupement des inclusions) sur les triglycérides. L'effet solubilisant n'est certes pas très important, mais suffisant pour

qu'on émette des doutes sur l'état "natif" des images observées. A cette action lipodissolvante de polyéthylèneglycols d'ampleur réduite, se superpose un phénomène d'entrainement physique dont l'importance nous paraît beaucoup plus grande, bien que sous-estimée jusqu'à présent. Dans les tissus préfixés au formol-calcium, les lipides "neutres" sont simplement maintenus in situ par stabilisation de la charpente protéique. L'action directe du formaldéhyde exposée plus haut, ne constitue nullement une fixation sensu stricto et on a vu qu'elle amène la disparition progressive des inclusions grasses par formation de produits hydrosolubles des tissus végétaux.

Les acides gras qui interviennent dans la constitution des gouttelettes lipidiques des cellules végétales sont dans leur grande majorité insaturés ou fortement insaturés et les enclaves grasses ont ainsi un point de fusion très bas. Dans les conditions d'inclusion utilisées avec les polyéthylèneglycols à + 45° C, leur viscosité est très réduite. La pénétration des carbowaxes très visqueux déplace mécaniquement les gouttelettes lipidiques, et la plupart sont ainsi extraites des tissus par un mécanisme purement physique en rapport avec les viscosités relatives des différents composés (47). Ce phénomène, dont le retentissement sur la teneur des cellules en lipides, après inclusion, est très important, paraît avoir échappé aux auteurs antérieurs. Mais il est vrai qu'aucune étude n'a été réalisée à l'heure actuelle sur la préservation intracellulaire des lipides dans les tissus végétaux après inclusion dans les carbowaxes. Et le comportement des lipides végétaux à cet égard doit différer notablement de celui des lipides des cellules animales, à point de fusion plus élevé.

La fixation in situ des lipides, par formation entre ces derniers et le fixateur de composés stables plus résistants à l'entrainement mécanique, est donc apparue indispensable. Le mode d'action du tétroxyde d'osmium sur les triglycérides est maintenant bien connu, ainsi que la nature des produits de condensation qui en dérivent (2, 17, 159, 162, 270), et l'on peut considérer que ce corps constitue un fixateur satisfaisant des esters insaturés. Le noircissement des lipides, après action au tétroxyde d'osmium,avec ou sans traitement réducteur, a été mis à profit par de nombreux auteurs pour localiser les gouttelettes intracellulaires (285). Toutes les études morphologiques et quantitatives montrent cependant qu'une partie au moins de ces produits n'est pas suffisamment stable et peut être extraite par les solvants utilisés préalablement à l'inclusion dans la paraffine ou dans les résines epoxy (16, 51, 52, 66, 193). Ces études critiques, effectuées par comptage des produits marqués au cours desdifférentes étapes de la déshydratation montrent toutes des pertes appréciables en lipides à ce stade, ainsi qu'au cours de l'inclusion ultérieure, et ceci quelles que soient les précautions prises pour réduire au minimum les contacts des objets avec les solvants ou les milieux d'inclusion (145, 146). Ainsi l'étude des lipides sur coupes à la paraffine de blocs osmiés, qui a été préconisée (244), ne semble pas pouvoir être réalisée dans des conditions très rigoureuses. L'emploi de fixateurs chromo-osmiques (156) ne paraît pas adéquat en raison des sous-produits d'oxydation labiles formés avec les sels de chrome. En ce qui concerne le prétraitement des tissus, les meilleurs résultats sont fournis avec une double fixation aldéhyde/osmium. Nous avons utilisé le formaldéhyde mais l'on peut attendre des résultats comparables de l'emploi du glutaraldéhyde ou de l'acroléine.

L'association entre une technique de fixation adéquate, respectant l'infrastructure cellulaire et maintenant in situ les lipides, et une méthode d'inclusion peu drastique, nous paraît constituer un progrès dans l'étude microscopique des lipides cellulaires.

Outre son utilisation pour la mise en évidence des triglycérides insaturés, cette méthode pourrait être utilisée avec profit pour localiser les autres inclusions "lipomorphes" des cellules végétales, dans la mesure où elles

constituent avec le fixateur utilisé des associations stables. On peut envisager de conserver ainsi dans les cellules les produits d'excrétion (terpènes)dont la plus grande partie, sinon la totalité, ne peut être observée par les techniques classiques. Une étape préalable consiste en l'identification des complexes formés et la vérification de leur maintien in situ. Les difficultés technologiques rencontrées dans l'emploi des carbowaxes interdisent cependant, pour le moment, leur utilisation comme milieux d'inclusion de routine.

4.3.- MISE EN EVIDENCE CYTOCHIMIQUE DES PROTEINES CELLULAIRES.

Parmi les techniques utilisées pour la mise en évidence de la fraction protéique des cellules de STRASBURGER, nous n'avons retenu dans le chapitre qui leur est consacré que celles qui nous ont fourni un résultat positif. Nous n'avons,assez curieusement,pu obtenir de bons résultats avec des méthodes classiques et très sûres ; en particulier celles amenant la production d'aldéhydes que l'on peut mettre en évidence avec le réactif de SCHIFF (ninhydrine/SCHIFF, alloxanne/SCHIFF, chloramineT/SCHIFF), et également la réaction à l'hydrazide hydroxynaphtoique pour la caractérisation des groupements terminaux carboxyles. Ces résultats négatifs peuvent être imputés à des défaillances expérimentales, à une fixation inadéquate, mais aussi à une altération des produits réactifs, qui sont assez instables.

Au contraire, les colorants acides utilisés dans des conditions précises de pH et, dans le cas du vert rapide, après extraction trichloracétique, fournissent des colorations intenses et précises. Les noyaux cellulaires apparaissent cependant beaucoup plus intensément colorés que le cytoplasme environnant (Pl. 28 a et b). La coloration de protéines basiques par le Fast Green FCF a été assez largement utilisée sur différents tissus animaux (70) ou végétaux (141, 142) et peut faire l'objet d'évaluations quantitatives (103, 165, 292).

Parmi les réactions de groupe utilisées, la tétrazoréaction produit une coloration intense des cytoplasmes et des noyaux dans des tons brun-violacé favorables à l'observation microscopique (Pl. 28, c). Le couplage des groupements aminés par le dinitrofluorobenzène produit également des résultats très satisfaisants. Les coupes peuvent être observées sans post-traitement, dans la variante de ZERLOTTI et ENGEL : les cytoplasmes et noyaux prennent une coloration jaune très intense (Pl. 28, e). Un traitement ultérieur des préparations au trichlorure de titane selon TRANZER et PEARSE amène la formation d'une teinte rouge plus distincte. Les 3 techniques ci-dessus fournissent donc des images précises et des colorations intenses. Les résultats obtenus avec d'autres méthodes globales ne sont pas aussi satisfaisants : la technique OTA de DIXON et la réaction à l'hydroxynaphtaldéhyde nous ont paru moins précises ; mais dans ce dernier cas, la qualité du coupleur terminal (fast blue B salt) doit jouer un rôle déterminant (Pl. 28, d).

Les méthodes destinées à mettre en évidence de façon sélective certains groupements terminaux fournissent des images bien plus pâles, étant donné la concentration relativement faible des dits groupements par rapport à l'ensemble des radicaux amine présents dans les coupes. Ces techniques fournissent cependant des indications précises et significatives.

Ainsi la diazotation à l'acide S produit une coloration violacée dans les noyaux et, à un moindre degré, dans les cytoplasmes, ce qui traduit la présence d'une quantité appréciable de tyrosine au sein des protéines cellulaires.

L'arginine, caractérisée selon la technique de CARVER, BROWN et THOMAS, a une localisation essentiellement nucléaire. Par contre, la coloration bleue très pâle produite après action du diméthylaminobenzaldéhyde et de l'acide nitreux, selon LISON et PINHEIRO, est largement répartie dans le cytoplasme (Pl.28,f).

Le tryptophane n'a donc pas une concentration particulière dans le noyau, comme les précédents (voir à ce sujet les travaux récents de TRIPODI sur les cellules haustoriales de Cuscuta (280).

Pour chacune des réactions considérées des contrôles ont été pratiqués. Pour les réactions de groupe, la déamination selon STOWARD est la plus efficace ; cette technique préserve également très bien les coupes, ce qui n'est pas le cas des méthodes faisant intervenir une acétylation, toujours drastique pour les structures cellulaires.

Il n'y a pas, pour les réactions que nous avons effectuées, de fixation "universelle" et chacun des prétraitements envisagés nous a, tour à tour, donné les meilleurs résultats selon les techniques considérées. Aussi est-il bon, pour ce genre d'investigation, de traiter simultanément cinq ou six jeux de lames provenant de blocs ayant subi des fixations différentes. La meilleure fixation sur le plan cytologique est rarement compatible avec la production d'une coloration très intense, pour la raison simple que plus la fixation est énergique - donc bonne après infiltration à la paraffine - moins il y a de groupements réactifs accessibles et non engagés dans des associations impossibles à démasquer. A cet égard la fixation par le formol neutre ou le formol-calcium, déplorable sur le plan cytologique, fournit souvent les colorations les plus intenses.

Des diverses observations réalisées à l'aide des techniques ci-dessus, on peut tirer un certain nombre de conclusions. Les cellules de STRASBURGER renferment un grand nombre de groupements "acidophiles" que l'on peut mettre à l'état ionisé à un pH très faible (jaune naphtol S). Ces groupements appartiennent à des protéines fortement basiques puisqu'ils continuent à prendre les colorants acides à un pH élevé (fast green FC) ; dans ce dernier cas, il faut au préalable éliminer les acides nucléiques en présence desquels la coloration est beaucoup plus faible. Les noyaux des cellules albumineuses et, à un moindre degré, les cytoplasmes, sont donc riches en histones. On peut y déceler de façon sélective un acide aminé basique, l'arginine, et deux acides aminés aromatiques, la tyrosine et le tryptophane. La plupart des groupements réactifs peuvent être conjointement mis en évidence par des méthodes de couplage (tétrazoréaction, dinitrofluorobenzène) aboutissant à la formation d'un complexe coloré.

Il est intéressant de constater que l'intensité des colorations obtenues est variable selon les types cellulaires à l'intérieur même du tissu de transfert, et, à un niveau donné, entre cellules voisines. La réactivité des cellules est en fait étroitement liée à leur degré de vitalité. Les observations en microscopie électronique montrent que les cellules chlorophylliennes restent parfaitement fonctionnelles jusqu'aux dernières semaines précédant la chute des aiguilles. Or leur teneur en histones nucléaires est toujours élevée, les colorations cytoplasmiques moindres correspondant à la vacuolisation importante du cytoplasme. Un certain nombre de cellules médianes présentent par contre des signes de dégénérescence, plus ou moins accusés. A ce début de nécrose est manifestement lié un affaiblissement des colorations obtenues au niveau des noyaux et des cytoplasmes. De la même façon, entre cellules vivantes, certaines cellules présentent une densité de coloration particulièrement élevée, ce qui correspond à une forte teneur en protéines nucléaires et cytoplasmiques, elle-même liée très probablement au degré d'activité cellulaire.

La mise en évidence de la fraction protéique des cellules végétales, et plus spécialement des histones, paraît donc devoir donner des indications quant à leur degré de vitalité et de participation au métabolisme général.

## 4.4.- DONNEES FOURNIES PAR LES DIGESTIONS ENZYMATIQUES A LA RIBONUCLEASE ET A LA PRONASE

L'extraction sélective de certains constituants cellulaires par des enzymes appropriées peut fournir des indications quant à leur nature chimique. Nous avons cherché à caractériser plus précisément, par le biais de ces méthodes, la nature des inclusions denses des chloroplastes et des "formations morulaires" présentes dans les cellules médianes.

### 4.4.1. Action de la ribonucléase

Sur des tranches minces de tissus préfixés au glutaraldéhyde et incubés dans une solution de ribonucléase, on constate un affaiblissement progressif et spécifique du contraste des inclusions chloroplastiques (Pl. 29, a à d). L'effet de l'enzyme est assez long à se manifester mais, apparemment, une fois qu'a débuté la dépolymérisation des ARN, elle se poursuit à un rythme beaucoup plus rapide. Effectuée sur ultracoupes, après oxydation à l'iodate de sodium, l'extraction n'est pas aussi démonstrative, même en prolongeant le temps de séjour des grilles sur la solution de ribonucléase (Pl. 29, e). Les formations morulaires ne paraissent pas modifiées par le traitement à la ribonucléase, quelles qu'en soient les modalités expérimentales (Pl. 29, f).

### 4.4.2. Action de la pronase

Utilisée sur coupes fines après oxydation, la pronase n'a pas eu d'effet significatif sur les différentes ultrastructures. Sur tranches minces incubées par contre, on observe rapidement une digestion enzymatique de la fraction protéique des cellules. Cette digestion n'est pas, naturellement, spécifique et concerne la totalité des organites et des structures membranaires. On observe ainsi un éclaircissement général du noyau et du cytoplasme, concernant tout autant la trame hyaloplasmique que les ribosomes. Dans les chloroplastes il y a tout d'abord désorganisation du stroma, qui disparait sous forme soluble dans le milieu d'incubation. Les inclusions denses sont résistantes à la digestion. Le contraste des structures filamenteuses internes s'atténue mais elles restent organisées alors même que la membrane externe du chloroplaste a été rompue par dissociation des protéines structurales (Pl. 29, g et h). L'inclusion est alors libérée dans le milieu cellulaire et on y discerne encore la structure habituelle. Les formations morulaires des cellules médianes ne présentent aucune sensibilité particulière à l'attaque enzymatique. L'attaque enzymatique induit une forte lipophanérose au niveau des plasmodesmes (Pl. 29, i).

### 4.4.3. Conclusions

L'expérimentation réalisée à l'aide de ces deux enzymes semble donc montrer que les inclusions denses des chloroplastes sont essentiellement constituées de ribonucléoprotéines filamenteuses à très forte teneur en ARN, étroitement enchevêtrées et limitées par une membrane. La réduction considérable du contraste en microscopie électronique permet d'exclure la présence d'une quantité appréciable d'acide désoxyribonucléique, dans la mesure naturellement où la préparation utilisée était dépourvue de DNase ce qui semble être le cas. L'extraction par la ribonucléase et la pronase ne permet pas cependant, pour le moment de préciser la nature des formations morulaires. La digestion sur tranches minces préfixées fournit de meilleurs résultats que si elle est réalisée sur ultracoupes oxydées.

## 4.5.- MISE EN EVIDENCE D'ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES CELLULES DE STRASBURGER

L'observation au microscope optique permet de comparer l'importance des activités enzymatiques des cellules de STRASBURGER par rapport aux autres tissus de l'aiguille. On peut ensuite localiser les sites d'activité au niveau des infrastructures.

### 4.5.1. Phosphatase acide

1. Localisation de la phosphatase acide en microscopie optique

L'activité phosphatasique est localisée à la périphérie des cellules du chlorenchyme, donc dans leur cytoplasme pariétal, dans les cellules parenchymateuses de transfusion , dans les cellules de STRASBURGER et dans les éléments criblés fonctionnels (Pl. 30, a). C'est dans le tissu de transfert que l'activité semble la plus intense. On ne discerne pas de différence entre la partie chlorophylliennedu tissu et ses parties plus internes (Pl. 30, b).

2. Localisation au niveau infrastructural

Les sites d'activité de l'enzyme sont essentiellement concentrés dans le plasmalemme et les vacuoles et, à un moindre degré, dans la paroi pectocellulosique.

Le plasmalemme, après incubation dans le milieu réactif, apparaît lourdement souligné de précipités de plomb très opaques, alors que, dans la paroi, les particules denses sont beaucoup plus clairsemées (Pl. 32, a).

Toutes les vacuoles des cellules médianes sont riches en phosphatase acide (Pl. 31, c). Le produit de réaction souligne fortement le tonoplaste ou remplit la totalité des vacuoles sous forme de précipités grumeleux (Pl. 31, c) ou aciculaires (Pl. 31, b). L'activité enzymatique est plus réduite dans les cellules chlorophylliennes. Aucun compartiment cellulaire ne présente d'activité significative. Plastes et mitochondries sont généralement dépourvus de marquage (Pl. 32, e). Le reticulum endoplasmique réagit parfois faiblement.

Sur des coupes incubées en l'absence de béta-glycérophosphate, ou dans un milieu complet additionné de fluorure de sodium, on constate que des précipités non enzymatiques peuvent se produire à la périphérie de cellules en général nécrotiques. Un léger dépôt de plomb peut aussi s'observer sur les parois et sur les noyaux (Pl. 32, f et g). La localisation et l'apparence de ces précipités les distinguent de ceux observés en présence de substrat. Les vacuoles et le plasmalemme sont donc bien le siège d'une activité phosphatasique acide. La localisation de ces activités sur la paroi est plus sujette à caution étant donné qu'une faible réaction peut être observée à ce niveau chez les témoins.

4.5.2. Glucose-6-phosphatase

1. Localisation de la glucose 6 phosphatase en microscopie optique.

Seules les cellules de STRASBURGER et les tubes criblés fonctionnels présentent une activité enzymatique suffisamment intense pour être visualisée au microscope photonique (Pl. 30, c). L'enzyme paraît plus abondante à la périphérie du tissu de transfert : cellules chlorophylliennes (Pl. 30, d).

2. Localisation au niveau infrastructural

Dans les cellules chlorophylliennes, où elle est plus visible, l'activité enzymatique est essentiellement liée au plasmalemme, à la paroi cellulaire, et aux mitochondries. On peut également observer une réaction très modérée dans les chloroplastes.

Dans le plasmalemme et la paroi, l'enzyme a une distribution comparable à celle de la phosphatase acide. L'activité concerne autant le plasmalemme lui-même que l'espace périplasmique et les "fossettes sécrétrices" qui participent au renouvellement de la paroi (Pl. 30, c et e), alors que la réaction phosphatasique acide est limitée au plasmalemme. Cependant sa répartition est plus irrégulière ; elle présente une affinité particulière pour les portions de parois garnies de plasmodesmes (Pl. 30, e). On constate, à ces niveaux, que l'activité enzymatique est non seulement présente de part et d'autre de la paroi, dans la pellicule ectoplasmique, mais aussi au sein même du tubule plasmodesmique, dans le desmotubule. Le canal central dans lequel confluent les plasmodesme paraît être également le siège d'une activité glucose 6 phosphatasique. Il semble cependant que le dépôt de plomb à ce niveau ne corresponde pas toujours à une activité enzymatique. Les précipités de plomb observés dans le chondriome sont situés à proximité immédiate des crêtes mitochondriales (Pl. 31, a et b). On peut donc supposer que l'enzyme fait partie intégrante de ces crêtes dont on connaît le rôle dans les transferts d'énergie intracellulaires.

L'enzyme paraît avoir une répartition plus large que la phosphatase acide. Ainsi, dans certaines conditions, la périphérie de petites vacuoles ainsi que des gouttelettes lipidiques apparaissent bordées de plomb (Pl. 30, a, b et c). Le reticulum endoplasmique et les chloroplastes peuvent réagir faiblement (Pl. 30, d).

3. Influence de la fixation

La glucose 6 phosphatase est une enzyme fragile et il est probable que les sites d'activité les moins importants n'apparaissent pas sur les ultracoupes. Divers facteurs paraissent avoir une influence décisive sur sa conservation, et la durée de fixation ne constitue que l'un d'entre eux. Il n'y a pas automatiquement corrélation inverse entre cette durée et la préservation de l'enzyme. Dans certains blocs fixés plus longtemps, l'enzyme est parfois mieux préservée. Le glutaraldéhyde ne constitue assurément pas le fixateur de choix sur notre matériel et nous avons obtenu de meilleurs résultats avec l'hydroxyadipaldéhyde et le glyoxal. Mais, une fois de plus, les images obtenues sont inconstantes, ce qui suggère que seule une fraction des niveaux cellulaires contenant l'enzyme peut être observée.

### 4.5.3. Conclusion

Nos observations montrent clairement que les cellules de STRASBURGER de l'aiguille sont le site d'importantes activités phosphatasiques. La phosphomonoestérase et la glucose-6-phosphatase sont également très abondantes dans les éléments criblés. On peut donc penser que leur présence est liée à la transformation et à la translocation des produits du métabolisme. Les systèmes membranaires du tissu de transfert, et la membrane plasmique en particulier, joueraient ainsi un rôle essentiel dans la fourniture, aux éléments criblés, de molécules à haut niveau d'énergie, aptes à migrer rapidement dans le phloème.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

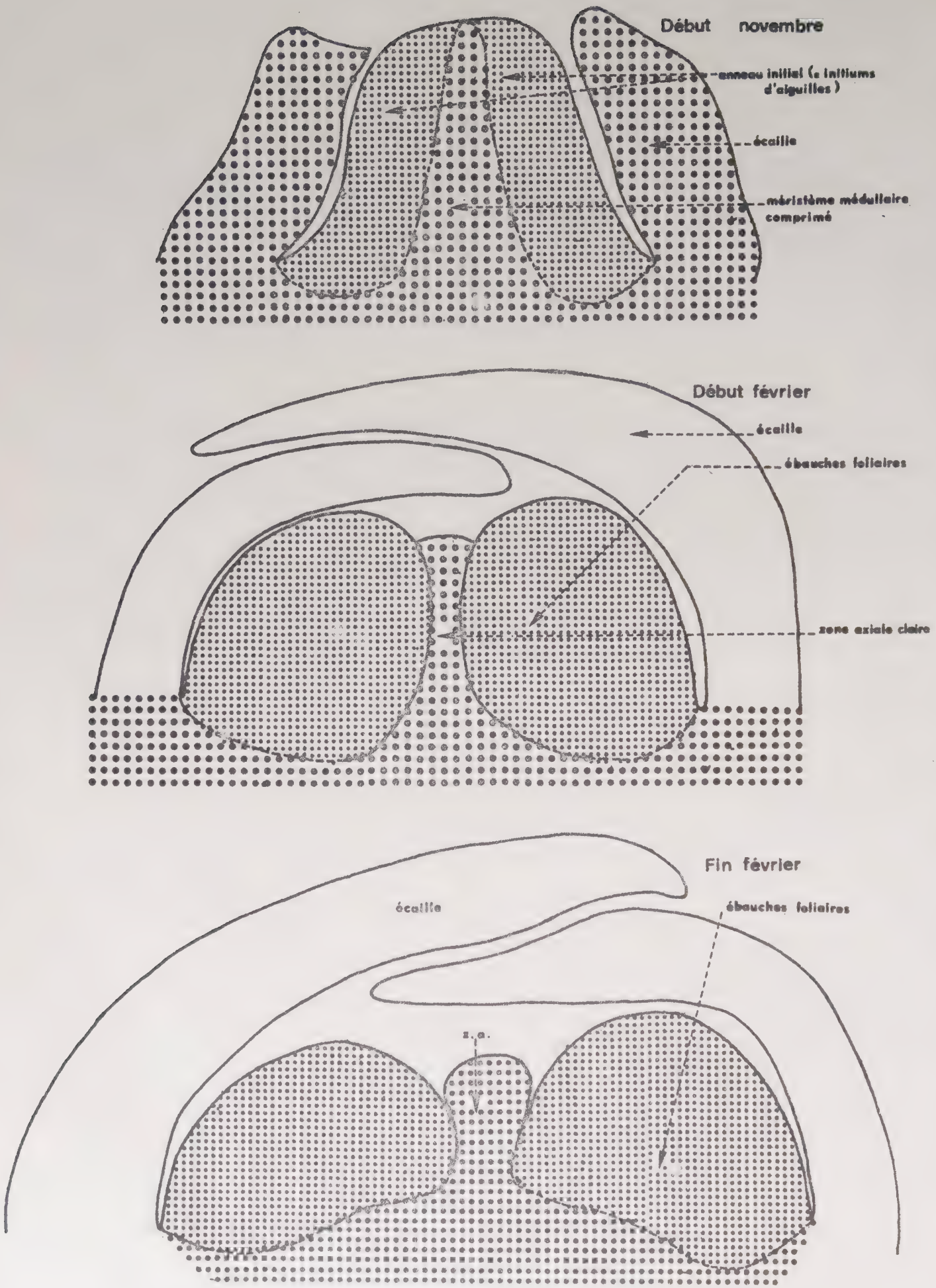



Fig.3. Premiers stades de différenciation des ébauches foliaires (d'après MORISSET, 1966).

## CHAPITRE V - ETUDE ONTOGENIQUE DU TISSU DE TRANSFERT

### 5.1.- EVOLUTION HISTOLOGIQUE.

#### 5.1.1. Introduction

Les relations étroites qui existent entre le tissu de transfert et les tissus conducteurs nous imposent d'étudier parallèlement leur développement. Le mode de différenciation des brachyblastes et la formation des initiums foliaires ont été clairement précisés par CAMEFORT (42), dont les travaux ont été repris ultérieurement (*).

Les aiguilles s'initient en novembre sur les brachyblastes mis en place en juillet par le bourgeon terminal. L'anneau initial du brachyblaste est entièrement utilisé pour la formation des aiguilles ; son méristème médullaire cesse alors de fonctionner (Fig. 3).

Le point végétatif des pousses courtes n'a donc qu'une activité très limitée à la différence du point végétatif des pousses longues qui fonctionne de manière indéfinie. La croissance des aiguilles se réalise grâce à l'activité d'un méristème basal situé à la jonction des aiguilles avec le rameau court, et dont le mode de fonctionnement est jusqu'à présent inconnu.

#### 5.1.2. Les premiers stades du développement (jusqu'au 10 mars environ)

Dès le 20 janvier se manifeste au sein du méristème terminal un début de clivage qui va se poursuivre par l'accroissement progressif des massifs latéraux méristématiques issus de l'anneau initial et qui constituent les primordiums foliaires, la zone centrale restant inactive.

Au début du mois de mars, les ébauches foliaires ont environ 400 µ de long et sont nettement individualisées. L'extrémité du massif cellulaire présente déjà la forme pointue de l'aiguille adulte et, en coupe transversale, le corps de l'ébauche a un aspect hémicirculaire caractéristique. La plus grande partie du primordium est constituée d'un méristème peu différencié : les cellules ont une paroi mince et un gros noyau ; on discerne dans les cellules périphériques (protoderme) quelques petites vacuoles tannifères périnucléaires (Pl. 34, a).

Si dans la partie haute de l'aiguille, le parenchyme fondamental est peu différencié, on discerne à la base, et surtout dans le rameau court, l'amorce d'un procambium placé en position centrale. Les cellules procambiales apparaissent plus petites en section transversale (du fait de cloisonnements longitudinaux) et pourvues de gros noyaux (Pl. 34, b).

---

* R. MORISSET, 1966, Etude morphogénétique du bourgeon terminal de Pin maritime. D.E.S. Sciences Naturelles, Bordeaux

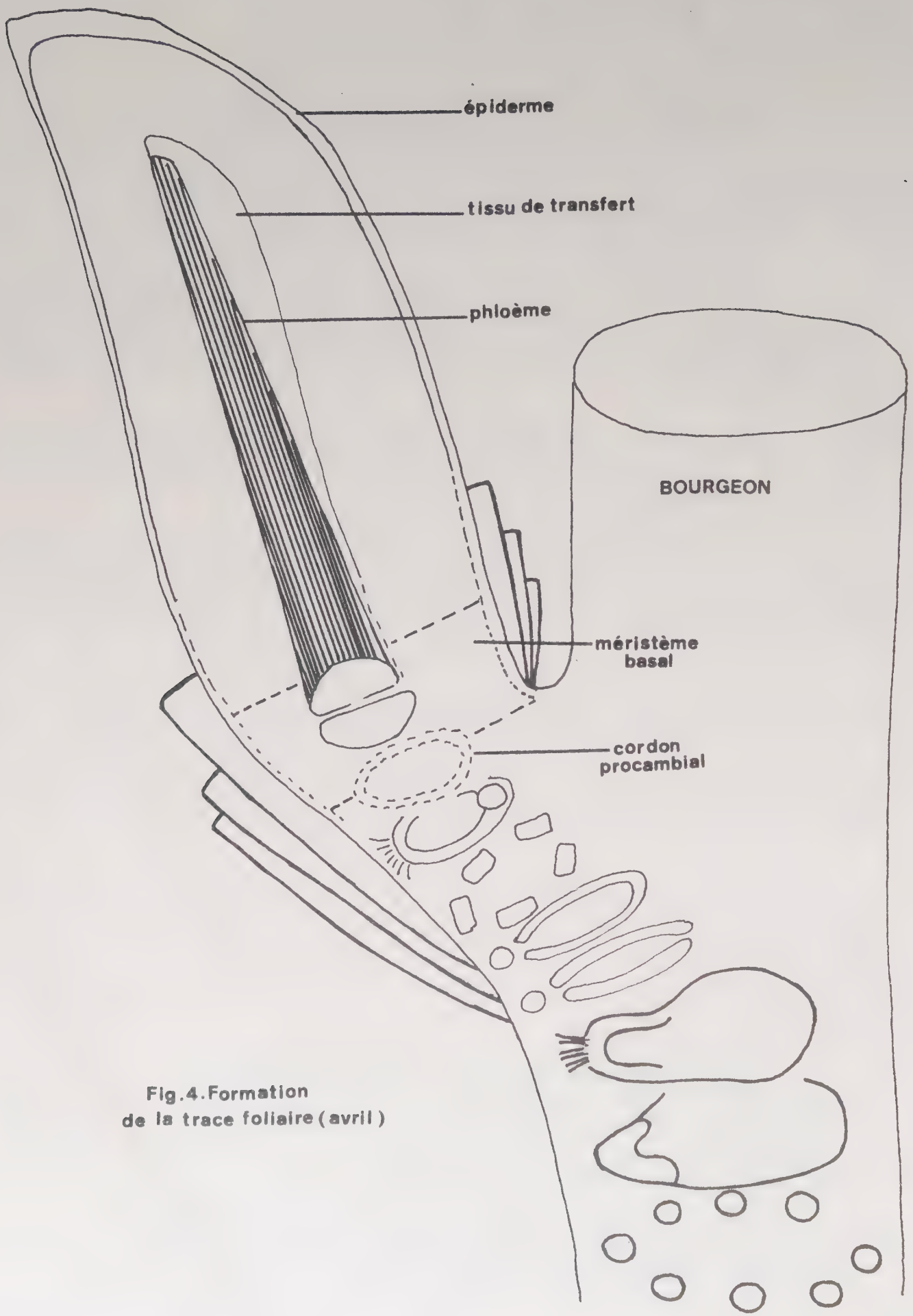



Fig.4. Formation de la trace foliaire (avril)

Origine des tissus vasculaires de l'aiguille

Au niveau de la zone d'implantation des brachyblastes, le bourgeon a une structure primaire de tige. Les tissus conducteurs sont représentés par des faisceaux cribrovasculaires isolés, disposés concentriquement autour d'un parenchyme médullaire. Le phloème et le xylème sont incomplètement différenciés et il persiste entre ces deux tissus plusieurs assises procambiales.

Les tissus conducteurs de l'aiguille sont issus d'un cordon procambial relié au procambium de l'axe par l'intermédiaire du rameau court qui les porte. La trace "foliaire" émise par l'anneau provasculaire discontinu s'isole rapidement et adopte à son tour une structure concentrique individualisée qu'elle conserve jusqu'à sa mise en relation avec les pseudophylles. Cette disposition circulaire est néanmoins perturbée à divers niveaux intermédiaires par l'émission de nouvelles traces conduisant essentiellement aux écailles et aux gaines entourant le rameau court en formation et les jeunes aiguilles (Fig. 4).

La différenciation vasculaire du cordon procambial émis par le bourgeon diminue pour atteindre un minimum au sommet du brachyblaste, où la totalité de l'anneau conducteur est constituée de procambium indifférencié. Le manchon procambial est alors constitué de cellules d'assez fort calibre, à paroi mince, qui subissent dans la base de l'aiguille une série de recloisonnements d'où sera issu le procambium de l'aiguille. Le nombre des cellules procambiales au sommet du brachyblaste augmente progressivement au début de la croissance de l'aiguille, ce qui entraine un accroissement correspondant du volume des tissus provasculaires de l'aiguille. Dans cette dernière, la zone de recloisonnement procambial se situe à un niveau où les tissus périphériques ne constituent qu'un méristème basal totalement indifférencié.

Une fois les tissus conducteurs mis en place au sein de l'ébauche, la croissance en longueur de l'aiguille résulte de l'activité (division et allongement) d'un méristème basal résiduel situé juste au-dessus de la zone de séparation des deux aiguilles hors du brachyblaste, et donc distinct pour chaque ébauche. Le méristème "apical" du rameau court ne subit au contraire, pendant l'allongement de l'aiguille, que des remaniements très limités.

5.1.3. Evolution des cellules albumineuses : étude des coupes sériées d'une aiguille en voie de développement. Origine et devenir des différents types cellulaires.

Il est possible, à partir de l'examen d'un stade évolutif intermédiaire, de retracer l'ontogénie du tissu de transfert. L'étude de coupes sériées, effectuées en l'occurrence dans une aiguille prélevée le 6 mai 1970 peut servir de base de départ pour préciser l'évolution dans le temps et dans l'espace, des cellules albumineuses. En partant de la description des aspects observés à divers niveaux, nous nous efforcerons d'en préciser l'origine et le devenir en fonction des observations que nous avons effectuées à des stades successifs de l'évolution de l'aiguille.

5.1.3.1. Partie sommitale de l'aiguille

La partie aciculaire de l'aiguille est revêtue par un épiderme fortement cutinisé, dépourvu de contenu structuré, sous lequel s'organise un chlorenchyme moins différencié que dans les parties basses. L'épiderme est issu d'initiales protodermiques précocement individualisées. Les autres tissus dérivent d'un méristème fondamental primitivement indifférencié au sein duquel se distinguent successivement le parenchyme chlorophyllien, l'endoderme et le tissu de transfusion. La maturation des tissus extérieurs au procambium s'effectue en di-

rection acropète. Le cylindre central (qui n'apparaît qu'à 100µ de la pointe) est limité par l'endoderme tannifère et ne contient pas, à l'extrémité, de structures vasculaires différenciées : le cordon procambial émis par le brachyblaste s'arrête à une certaine distance de la pointe. L'extrémité est occupée, à l'intérieur de l'endoderme, par de grosses trachéides de transfusion lignifiées, pourvues de ponctuations aréolées. Plus bas, on observe, au sein du tissu de transfusion une différenciation entre des cellules lignifiées à paroi mince, ou trachéides courtes, qui perdent leur contenu (ce sont les seules présentes à l'extrême pointe) et des cellules parenchymateuses qui restent vivantes et élaborent des tanins.

Un peu plus bas, on voit apparaître sur les coupes transversales, dans la région centrale de l'aiguille, un massif de petites cellules :

- les unes, très petites, ont une paroi mince, flexueuse, peu chromophile ; elles représentent l'extrémité apicale du procambium .
- les autres se colorent fortement par le bleu alcian ; elles constituent les cellules albumineuses I. Elles sont longues de 80 µ environ et apparaissent polyédriques, fréquemment pentagonales ; en outre, leur paroi est droite, non contournée (Pl. 35, c).

En fait, la partie terminale du procambium ne produira ultérieurement que du xylème, après que les cellules procambiales aient subi quelques divisions, et surtout que leur paroi se soit fortement épaissie. A la pointe de l'aiguille, le tissu albumineux est donc affronté au procambium. Mais ce procambium a une vocation ligneuse, donc dissymétrique, et ne fournira pas de phloème. A la place des éléments criblés inexistants, on observe des cellules albumineuses. On constate que le nombre des cellules albumineuses apicales augmente au début de la croissance de l'aiguille (Pl. 34, b à d). Certaines parmi ces cellules restent donc peu différenciées et capables de se diviser.

5.1.3.2. Evolution des différents tissus sur coupes successives, dans la partie moyenne de l'aiguille

Les éléments criblés qui se différencient un peu plus bas (200 µ) aux dépens du cordon procambial central semblent de ce fait apparaître au milieu des cellules albumineuses ; en réalité, leur différenciation rejette les cellules albumineuses en position latérale (Pl. 35, d et e). Très rapidement, dans l'espace et dans le temps, leur nombre augmente et un massif cribro-vasculaire différencié haploxylé va s'organiser. Ce massif est constitué d'éléments criblés de protophloème à parois assez minces, flanqués sur les côtés de cellules albumineuses I à paroi vivement colorée par le bleu astra, et sur sa face adaxiale de trachéides encore non lignifiées (le phloème est mûr avant le xylème). Entre les éléments criblés et les trachéides,on observe une ou deux assises méristématiques d'aspect "cambial" à partir desquelles se constituera ultérieurement le métaphloème. Le tissu albumineux est donc, au sommet de l'aiguille, placé en position apicale sur le phloème, en continuité avec les éléments criblés, mais il est très rapidement déjeté sur les flancs de part et d'autre. Les cellules albumineuses ne sont plus mêlées sur toute la longueur de l'aiguille aux éléments criblés, mais regroupées sur les bords de chaque massif criblé (latéralisation du tissu de transfert : Pl. 36, a et b) Sous la zone différenciée qui comporte des cellules albumineuses du xylème et du phloème différenciés, il existe en contiguïté une zone avec procambium flanqué de cellules méristématiques qui constituent le tissu proalbumineux. Ces cellules aplaties se divisent surtout selon des plans plus ou moins parallèles au plan de symétrie de l'aiguille (divisions anticlines) pendant la période de différenciation du phloème primaire (Pl. 36, c).

Si l'on étudie les aspects successifs du faisceau conducteur et du tissu albumineux en direction basipète, on constate que le nombre des éléments constitutifs s'accroît régulièrement. Il semble cependant que l'augmentation de la masse des tissus conducteurs soit en rapport avec la production, par le brachyblaste, d'un cordon procambial de plus en plus important. Le tissu procambial continue cependant à se diviser dans l'aiguille, mais cette activité est surtout le fait de cellules situées au milieu du faisceau et d'aspect cambial, qui se recloisonnent activement à partir d'initiales de plus grand diamètre. Le xylème est en relation, sur les flancs, avec les trachéides courtes de transfusion déjà bien différenciées. De chaque côté du faisceau, on observe 9 à 10 cellules albumineuses qui sont en relation avec des éléments criblés à paroi assez épaisse.

En s'élargissant beaucoup plus vite dans le sens tangentiel que dans le sens radial, le massif cribro-vasculaire a tendance à s'aplatir en même temps qu'il s'incurve vers la face adaxiale. Il est toujours haploxylé. Des éléments de métaphloème, formés par cloisonnement et différenciation d'une seule assise de cellules procambiales, remplacent rapidement le protophloème, qui se résorbe au pôle libérien entièrement ceinturé par une assise de cellules polyphénoliques. On constate cependant que le développement du tissu albumineux, constitué de chaque côté par une douzaine de cellules plus grandes à paroi très distincte, à cytoplasme dense, est très important par rapport aux tissus conducteurs, le phloème en particulier. Le métaxylème est en cours de maturation. La néoformation (anticline) de cellules de STRASBURGER, à partir de cellules indifférenciées compense les éléments nécrosés disparus avec le protophloème.

Le cordon cribro-vasculaire est d'abord unique. Un peu plus tard, et donc plus bas dans l'aiguille, il se scinde en deux massifs indépendants séparés par des cellules allongées radialement, polyphénoliques (Pl. 35, h). Ces cellules ne proviennent pas du procambium, mais d'un méristème qui fait suite au méristème médullaire du brachyblaste, et qui n'existait pas dans la partie sommitale. Sur coupes transversales successives effectuées depuis la pointe de l'aiguille, ces cellules paraissent "s'implanter" au centre du faisceau alors qu'en fait leur apparition est liée à l'augmentation de volume des tissus vasculaires qui se dichotomisent. La plupart de ces cellules perdront ultérieurement leur contenu après que leur paroi se soit imprégnée de subérine. Dans certains cas, le massif vasculaire initial se divise en trois sous-unités; celle placée en position centrale est beaucoup plus réduite que les deux autres. Les cellules albumineuses deviennent plus nombreuses (17 à 20) ; elles sont toujours polygonales, étroitement jointives, fortement colorées. Leur paroi présente localement des expansions fusiformes beaucoup moins développées cependant que dans les cellules adultes.

Le début de l'activité cambiale se traduit par la multiplication de cellules à paroi mince, quadrangulaires en section, aplaties, situées naturellement entre le métaxylème et le métaphloème. Les aspects successifs observés sur des aiguilles d'âge croissant montrent que ces cellules font suite à l'assise unique génératrice du métaphloème ; elles vont être à l'origine d'éléments secondaires, peu nombreux du côté ligneux, mais dont la production vers le phloème va entraîner d'abord l'écrasement et la résorption des éléments du métaphloème les premiers formés, puis la disparition progressive de l'ensemble du phloème primaire. Les cellules albumineuses situées immédiatement contre les éléments de métaphloème meurent également mais sont remplacées simultanément par des cellules néoformées par la division de deux ou trois éléments peu différenciés situés sous les trachéides courtes de transfusion en même temps que débute l'activité cambiale. Ces cellules néoformées, ainsi que les cellules périphériques non concernées par le processus de nécrose, vont évoluer progressivement vers leur aspect cellulaire adulte. Le tissu albumineux est alors constitué, de chaque côté du faisceau, d'une vingtaine de cellules environ.

Ces deux processus de mérèse, chronologiquement simultanés, paraissent donc induits par le même stimulus. Mais ils sont d'une nature différente, tant par le mode de division des cellules concernées (divisions cambiales d'une part, cloisonnements irréguliers d'autre part) que par la nature des cellules produites. Les cellules albumineuses indifférenciées sont beaucoup plus grandes que les cellules cambiales.

L'étude de niveaux successifs, vers la base de l'ébauche d'aiguille, montrent que vont aller en s'accentuant un certain nombre de phénomènes : tendance à la dichotomisation et à épaississement radial du faisceau, dégénérescence des cellules situées à la partie supérieure du protoxylème, individualisation latérale des cellules albumineuses, toujours jointives et polygonales, nettement distinctes des cellules parenchymateuses de transfusion qui sont arrondies et polyphénoliques, épaississement de la zone cambiale. Les trachéides de transfusion, sont étroitement en relation avec le xylème par des trachéides de morphologie intermédiaire.

Le nombre des cellules de STRASBURGER paraît rester fixe (environ 20), la production de nouveaux éléments à partir des cellules indifférenciées situées sur la face adaxiale compensant la disparition de ceux accolés au métaphloème. Les plans de division des cellules-mères sont périclines et donc parallèles à ceux des cellules cambiales. De nouvelles cellules albumineuses se forment dans l'axe du métaphloème par division du stock cellulaire préexistant contre le métaphloème.

La bipartition du faisceau à l'instant considéré coïncide donc avec la régression du métaphloème qui va rapidement être complète. De chaque côté du faisceau diploxylé, en même temps que se poursuit l'activité de la zone génératrice (4 à 5 assises de cellules), les cellules albumineuses commencent à présenter une certaine différenciation morphologique. Celles qui viennent d'être produites par la division de cellules indifférenciées, sont aplaties et ont une paroi mince ; les plus anciennes situées à la périphérie s'arrondissent et leur paroi s'épaissit. Les premières trachéides de bois et les premiers éléments criblés secondaires subissent une maturation caractérisée par la formation, dans ces derniers, d'une épaisse paroi "nacrée".

La séparation des faisceaux liée à la multiplication des cellules interfasciculaires issues du méristème basal s'accentue mais les cellules polyphénoliques qui s'insèrent sont toujours vivantes et continuent à s'accroître et à se diviser. Le premier rayon issu de la différenciation d'initiales procambiales apparaît dans le faisceau.

Si l'on examine les aspects successifs des tissus vasculaires et des tissus périphériques depuis les parties hautes de l'aiguille jusqu'aux parties basses proches du méristème basal, on constate que vont s'imbriquer deux phénomènes différents :

- les tissus extérieurs au cordon vasculaire sont de moins en moins différenciés et l'évolution du tissu albumineux qui dérive d'un méristème proalbumineux, lui-même situé dans le méristème fondamental, va dans le même sens : l'ensemble des tissus non conducteurs subit donc une maturation acropète.

Dans la partie basale de l'aiguille, le chlorenchyme périphérique n'est plus plissé mais constitué de cellules arrondies. La distinction morphologique entre les cellules albumineuses et les cellules de transfusion se réduit ; ces dernières sont cependant plus petites et plus fortement colorées par le bleu astra, ce qui correspond à une synthèse plus active de constituants pariétaux.

Plus bas encore,la distinction entre les types cellulaires du tissu de transfusion s'atténue également : on ne distingue plus ni trachéides déformées ni cellulespolyphénoliques mais un ensemble cellulaire indifférencié bien que non méristématique, qui évoluera ultérieurement en tissu de transfusion mixte caractéristique.

- en outre , la production de tissus vasculaires différenciés ne cesse de s'accroître ; le volume du faisceau augmente considérablement. Les tissus, les premiers formés, ont une vie très brève. Mais, à cette différenciation de plus en plus poussée ne correspond pas une maturation équivalente : l'élaboration de parois caractéristiques s'effectue progressivement en direction acropète.

Dans les parties basses de l'aiguille, le faisceau libéro-ligneux s'accroît en largeur (3 ou 4 rayons) et en épaisseur du fait de la multiplication des éléments procambiaux constitutifs. Mais le degré de maturation de ces cellules est par contre très peu poussé.

5.1.3.3. La zone basale

A proximité du méristème basal, la distinction entre les différents types cellulaires de l'aiguille n'est pas aussi aisée qu'aux niveaux supérieurs. Le procambium est constitué de cellules à paroi mince, quadrangulaires en section, à divisions anticlines (Pl. 36, c et d). Le méristème de transfusion est au contraire constitué de grosses cellules. Entre ces deux méristèmes, le tissu proalbumineux indifférencié est en opposition avec le procambium car les cellules qui le composent subissent surtout des divisions périclines, donc perpendiculaires aux cloisonnements procambiaux. Le méristème de transfusion est disposé de façon assez anarchique.

Le nombre de cellules albumineuses différenciées s'atténue, on l'a vu, au fur et à mesure que l'on descend dans l'ébauche foliaire. Sur 300 ou 400 µ on n'observe plus dans le prolongement du métaphloème qu'une ou deux cellules caractéristiques, alors que le protophloème, pourtant différencié depuis peu, est déjà écrasé. Ces cellules persistent jusqu'à la zone de jonction au-dessus du brachyblaste, dans le méristème basal responsable de l'allongement de l'aiguille. On constate donc que leur présence coïncide avec celle de tissus périphériques non méristématiques et en particulier d'un parenchyme chlorophyllien fonctionnel.

Ce rapport ontogénique entre la différenciation du chlorenchyme d'une part, celle de cellules albumineuses d'autre part,suggère que l'apparition de ces dernières est liée à l'activité photosynthétique périphérique. Il y a un rapport entre le développement des chloroplastes dans le mésophylle et le nombre et la différenciation des cellules albumineuses situées contre le faisceau. L'évolution du tissu vasculaire est au contraire tout à fait indépendante.

Au contact du brachyblaste, la totalité des cellules périphériques sont méristématiques ou peu différenciées. Il n'en est pas de même des tissus cribro-vasculaires. Au pôle ligneux, on compte 2 à 3 éléments de protoxylème et 5 à 6 de métaxylème. Le reste du métaxylème n'est pas encore mûr. Le protophloème est entièrement résorbé et on observe, entre le métaphloème et le méristème de transfusion une zone d'autolyse importante dans laquelle se désagrège progressivement la paroi des éléments criblés les premiers formés, la "ceinture" de cellules tannifères à division péricline constituant une "zone d'appui". Les éléments de métaphloème ont une paroi épaisse et fortement colorée par le bleu astra (à la différence des éléments criblés secondaires, dont seule la lamelle moyenne est chromophile). La lumière des cellules criblées est importante, et

les dernières formées possèdent noyau et cytoplasme. Tous ces éléments sont jointifs, disposés irrégulièrement et non en files sériées comme dans le phloème secondaire. Ils n'ont pas non plus, comme ces derniers, un calibre constant. Il n'y a pas de rayons et probablement pas de parenchyme dressé.

Les initiales albumineuses sont situées dans la zone de division la plus interne de l'aiguille, au contact des trachéides courtes de transfusion non encore différenciées et elles-mêmes en division très active. Dans l'axe du métaphloème, on observe 2 ou 3 cellules peu différenciées, et au-dessus 6 ou 7 cellules d'aspect méristématique,petites, aux contours peu nets. On peut donc considérer à ce stade que le "stock" définitif de cellules albumineuses n'est pas encore constitué, et qu'il proviendra ultérieurement des cloisonnements successifs de cellules restées en attente. A plusieurs reprises au cours de la première année, intervient une phase de multiplication, suivie d'accroissement du volume cellulaire et de certaines modifications de la paroi. Les cellules néoformées proviennent toujours de cellules peu différenciées,situées sur la face adaxiale,qui seules conservent longtemps la capacité de régénérer progressivement le stock cellulaire dont une partie disparait au cours de l'évolution vasculaire, lorsqu'elles n'ont plus de signification fonctionnelle.

Il y a donc dans la même ébauche, à la même époque, un décalage important dans la différenciation et la maturation des éléments conducteurs selon le niveau considéré. Le "retard de différenciation" basipète affecte également les cellules albumineuses. Il peut ne plus y avoir à la base de cellules albumineuses I, cette disparition étant liée à la dégénérescence du protophloème, alors qu'à la pointe,le protophloème est fonctionnel et donc accompagné de cellules albumineuses I, la formation de cellules albumineuses II n'intervenant qu'ultérieurement.

5.1.4. Les stades ultérieurs du développement

L'évolution ultérieure du tissu albumineux est la même au sommet et au milieu de l'aiguille ; mais à la fin de la période d'allongement,le méristème basal ne produit plus de cellules de STRASBURGER mais un parenchyme indifférencié.

5.1.4.1. Evolution au sommet et au milieu de l'aiguille

Le fonctionnement du cambium amène la production d'éléments libériens qui remplacent progressivement les éléments du métaphloème. Les cellules albumineuses accolées au métaphloème se nécrosent et disparaissent progressivement, en même temps que ces éléments primaires. Elles ne sont pas écrasées cependant au pôle libérien, mais comprimées par le développement des cellules plus périphériques restées vivantes et des cellules indifférenciées situées sur la face adaxiale.

Ces cellules en expansion vont constituer les cellules albumineuses III, définitives. Elles augmentent de volume, perdent leur forme polygonale et deviennent arrondies (Pl. 36, e). Leur paroi s'épaissit (Pl. 36, f) et surtout il s'y développe les expansions plasmodesmiques caractéristiques de la cellule adulte. Ces épaississements hémisphériques ou en bouquet, naissent au contact de cellules albumineuses voisines (Pl. 36, g).

Les cellules qui étaient primitivement au contact du métaphloème, une fois comprimées, constituent le tissu albumineux "interne" mort dont l'évolution aura été chronologiquement liée à celle des tissus criblés primaires.

Les cellules albumineuses III en expansion, provenant de cellules II non nécrosées ou de cellules non différenciées, ne viennent pas s'accoler au phloème comme les précédentes. La production d'éléments criblés secondaires se réalise sans que s'établissent entre eux et les cellules albumineuses des communications plasmodesmiques. Mais le tissu albumineux va subir encore certains remaniements qui vont lui conférer sa structure définitive.

Outre la zone cambiale "normale" située entre bois et liber se développe sur les flancs du faisceau un cambium marginal d'un type particulier. On constate en effet, et spécialement en fin d'activité méristématique secondaire que certaines cellules de type cambial, situées entre les trachéides courtes de transfusion et les cellules albumineuses adaxiales, subissent des cloisonnements longitudinaux, d'autant plus nombreux qu'elles sont proches du faisceau. C'est à partir de ce cambium marginal que se forment les cellules "internes". Il s'agit de cellules parenchymateuses très allongées et disposées en ordre sérié qui constituent, le long du liber secondaire, un "rayon" qui le sépare des cellules albumineuses différenciées.

Ces cellules internes, cellules IV, sont produites d'une part par la dernière rangée de cellules cambiales (la plus périphérique), d'autre part par un cambium extrafasciculaire à fonctionnement unilatéral. On constate en effet qu'un certain nombre de cellules (une assise) situées sous les trachéides courtes de transfusion se divise et donne une ou deux couches de cellules internes comparables à celles produites directement contre le cambium (Pl. 36, g). Ces cellules ne présentent pas les caractéristiques morphologiques et infrastructurales des cellules albumineuses issues de la différenciation du méristème primaire. Elles ne possèdent pas en particulier les structures de transfert qui caractérisent ces dernières. Le tissu albumineux n'a plus alors de rapports physiologiques évidents avec le liber. La production de ces cellules "internes" n'est pas obligatoire. Elle ne se réalise pas toujours et il lui correspond parfois la formation d'éléments criblés, directement au contact, alors, avec les cellules albumineuses III.

Au cours des deux années ultérieures le massif albumineux ne subit de remaniements qu'en ce qui concerne les cellules internes IV. A chaque redémarrage de l'activité cambiale, il s'en produit un certain nombre qui vient s'ajouter au stock cellulaire préexistant (Pl. 36, h). Mais elles sont très allongées, à paroi mince et ne présentent pas la différenciation cellulaire caractéristique des cellules III.

L'adjonction de cellules internes au tissu de transfert est d'autant plus réduite que l'on se rapproche de l'extrémité de l'aiguille. A la pointe, il ne se différencie pas de cambium fonctionnel et les cellules albumineuses III sont directement en contact avec le métaphloème, qui ne reste apparemment fonctionnel que pendant quelques mois.

5.1.4.2. Evolution à la base

L'accroissement en longueur de l'aiguille se poursuit jusqu'à la fin du mois d'août mais le méristème basal ne produit plus, dans les derniers millimètres, de cellules albumineuses comparables à celles présentes sur la plus grande longueur de l'aiguille.

Dans la partie incolore de la pseudophylle, enveloppée de gaines, les massifs conducteurs très importants ne sont entourés que d'un parenchyme peu différencié auquel se mêlent des fibres sclérenchymateuses. Il n'y a plus, au contact du phloème, de cellules albumineuses, mais seulement un parenchyme banal dont l'importance va aller en décroissant jusqu'à la zone de jonction des aiguilles dans le brachyblaste. Le tissu de transfert fait place dans le rameau court à un système parenchymateux distinct, sans ornementations pariétales.

La production de tissu albumineux paraît donc liée à la présence, à la périphérie de l'aiguille, d'un parenchyme chlorophyllien différencié. Son importance relative, par rapport au phloème, diminue en direction basipète.

5.1.5. Conclusions

L'ensemble des observations résultant de l'étude systématique de coupes transversales sériées, effectuées dans les bourgeons, puis dans les ébauches foliaires et enfin dans les aiguilles, à des stades successifs de l'activité végétative, permet de dégager les notions générales suivantes. Le tissu albumineux situé dans la partie sommitale et la partie médiane de l'aiguille dérive de l'activité d'un méristème primaire distinct du procambium et initié dans le méristème basal qui assure la croissance en longueur de l'aiguille. Ce méristème "proalbumineux" est également distinct du méristème de transfusion auquel il est contigu. Il va fournir successivement trois types cellulaires différents que nous avons dénommés cellules albumineuses I, II, et III. A l'exception de la partie sommitale, dépourvue de tissus secondaires, le tissu de transfert de l'aiguille est constitué en outre de cellules issues de l'activité cambiale, les cellules albumineuses IV.

La maturation du tissu albumineux s'effectue en direction acropète. Elle se réalise en plusieurs phases qui correspondent, dans le temps et dans l'espace, aux stades d'évolution du phloème primaire et du liber.

La mise en place du tissu albumineux de l'aiguille jusqu'à la fin de sa période de différenciation (mi-octobre) s'est donc réalisée en 4 étapes :

1 - Au sein du méristème fondamental, au contact du procambium, se différencie un massif cellulaire distinct d'une part du tissu provasculaire, d'autre part du méristème de transfusion. Une partie de ce méristème "proalbumineux" évolue partiellement et s'accole au protophloème. Elles constituent les cellules albumineuses I.

2 - Dès qu'au sein du procambium se différencient les premiers éléments de métaphloème, l'autre partie du méristème proalbumineux, restée "en attente" se divise activement. Certaines seulement parmi les cellules néoformées (cellules albumineuses II) s'accolent aux éléments criblés, les autres étant situées à la périphérie. Toutes ces cellules évoluent de façon identique, mais l'ampleur des remaniements morphologiques est limitée (plasmodesmes simples regroupés dans des expansions fusiformes). Les cellules albumineuses I meurent et disparaissent, entrainées par la résorption du protophloème.

3 - La néoformation d'éléments criblés secondaires à partir de la zone cambiale s'accompagne de la dégénérescence progressive des cellules albumineuses accolées au métaphloème. C'est ainsi que va se constituer l'îlot interne de cellules mortes. Les cellules périphériques restent au contraire vivantes et évoluent rapidement jusqu'au stade adulte. Elles constitueront alors les cellules albumineuses III.

En effet, le nombre des cellules albumineuses II est fixé dès la mise en place du métaphloème; ces cellules ne subissent pas de division postérieure au départ de l'activité cambiale. Certaines cellules situées sur la face adaxiale sont cependant restées très indifférenciées. Les cellules périphériques représentent une partie de ce stock initial. Elles subissent jusqu'au bout le processus évolutif conduisant à la formation de cellules albumineuses différenciées typiques, processus qui était incomplet pour les cellules accolées au protophloème, puis au métaphloème.

Les aspects infrastructuraux de ce processus seront étudiés dans le chapitre suivant. Au plan morphologique, il se traduit par une augmentation de la taille et une modification de la forme des cellules albumineuses en section transversale initialement polygonale et qui devient plus ou moins arrondie. En outre, la paroi s'épaissit fortement et il s'y développe des structures de transfert plus ou moins différenciées, constituées de nombreux plasmodesmes en bouquet regroupés dans des excroissances ou des digitations pariétales. C'est au cours de la phase d'auxèse, qui se réalise en même temps que la différenciation de la paroi, que sont comprimées au centre du massif albumineux les cellules albumineuses II nécrosées.

4 - En fin d'activité cambiale un cambium marginal extrafasciculaire produit unilatéralement, du côté du tissu albumineux, quelques cellules analogues aux cellules parenchymateuses des rayons. Elles ne présentent pas la différenciation morphologique des cellules albumineuses III et constituent les cellules albumineuses IV. Les cellules internes ont donc une origine secondaire. Elles subissent un certain renouvellement annuel lié à l'activité cambiale, au cours des deuxième et troisième années.

Dans l'aiguille, les cellules albumineuses d'origine primaire continuent à être étroitement associées entre elles mais ne présentent plus de communications privilégiées avec le phloème. L'ontogénie du tissu albumineux ne peut donc être dissociée de celle du phloème. Les rapports entre les tissus criblés primaire, puis secondaire, avec le tissu albumineux provenant essentiellement d'un méristème primaire (formé à la base de l'aiguille dans le brachyblaste et dont la différenciation s'effectue en plusieurs étapes) sont délicats à suivre avec précision. Le tissu albumineux en effet, comme le phloème, est un tissu constamment "remis en question" pendant la première année. Il est constitué d'un stock cellulaire initialement peu important dont une partie au moins conserve longtemps la possibilité de se diviser pendant que l'autre subit une différenciation plus ou moins poussée, et éventuellement, disparaît.

## 5.2.- ETUDE ONTOGENIQUE INFRASTRUCTURALE

### 5.2.1. Le méristème fondamental. Mise en place de la paroi

Les cellules proalbumineuses présentent tout d'abord certains caractères de cellules méristématiques normales. La production de cellules fonctionnelles s'effectue par division mitotique d'une partie du stock cellulaire ; les autres cellules restent indifférenciées et, en se divisant à leur tour ultérieurement, fourniront les cellules de STRASBURGER associées aux divers stades d'évolution du phloème et des tissus périphériques.

Après la mise en place des plaques cellulaires au point de jonction des microtubules nucléaires émis par les noyaux fils (Pl. 39, a), les divers compartiments cellulaires vont s'organiser progressivement.

La paroi se différencie entre deux rangées très denses de microtubules étroitement imbriqués et enchevêtrés (Pl. 39, b). Contre les premiers tronçons de paroi ainsi constitués s'organise le plasmalemme qui en est séparé par un espace clair périplasmique et qui provient de la fusion des vésicules de la plaque cellulaire. Dans l'organisation primitive de la paroi, les microtubules nucléaires jouent donc tout d'abord un rôle fondamental. Lorsqu'elle est réalisée, ils vont progressivement disparaître mais ils persistent néanmoins, bien qu'en petit nombre, dans des cellules plus évoluées (Pl. 39, c) et même dans le tissu adulte (Pl. 49, c). Le cytoplasme fondamental est tout d'abord (Pl. 38, a) constitué d'une masse dense granuleuse dans laquelle il est difficile de discerner clairement les ribosomes. Les systèmes membranaires sont également indistincts.

Le réticulum endoplasmique apparaît initialement sous forme de travées plus claires au sein du hyaloplasme, non délimitées par une membrane (Pl. 38, c). Ces aspects proviennent peut-être cependant, d'une fixation inadéquate, provoquant une rétraction locale du hyaloplasme et la constitution de canalicules non limités par des membranes. Les proplastes ont un stroma très dense aux électrons, pauvre en lamelles, mais ils peuvent être très précocement amylifères (Pl. 38, b). Les mitochondries jeunes que l'on distingue des proplastes ont un système tubulaire également très rudimentaire (Pl. 38, d). Les dictyosomes sont visibles mais très peu actifs.

### 5.2.2. Différenciation des cellules albumineuses I contemporaines du protophloème

En même temps que se différencient, au sein du procambium, les premiers éléments de protophloème, apparaissent les cellules albumineuses I. Leur aspect infrastructural est le même, qu'elles soient placées en position sommitale affrontées au procambium (Pl. 40, fig. a) ou sur les flancs du faisceau (Pl. 42). Leur degré de maturation, par rapport aux cellules méristématiques dont elles sont issues, n'est pas très accentué . On peut cependant, dans le méristème proalbumineux, distinguer très tôt deux types cellulaires qui se différencient par la densité du hyaloplasme et l'épaisseur de la paroi. Un premier groupe est constitué de cellules à paroi assez mince, mais plus épaisse que celle des cellules procambiales contiguës (Pl. 40, b). Ces cellules se vacuolisent activement et subissent une certaine dilution cytoplasmique. Les plastes, les mitochondries, sont très peu différenciés, le réticulum endoplasmique est peu abondant, les corpss de Golgi peu actifs. Le deuxième type est représenté par des cellules très riches en ribosomes (Pl. 41, a), donc d'aspect très dense, dans lesquelles les divers organites ne sont pas plus évolués que dans les cellules précédentes (Pl. 41, b et 42). Mais la paroi est beaucoup plus épaisse et se creuse d'un canal central au niveau duquel confluent les plasmodesmes ; ceux-ci sont le plus souvent localisés à mi-distance des limites cellulaires (Pl. 42, e). Il n'y a pas d'accroissement en épaisseur de la paroi à leur niveau, et la structure des plasmodesmes individualisés reste simple (Pl. 42, f). Dans ces cellules, les microtubules ont déjà joué leur rôle dans la mise en place du phragmoplaste. De plus, les dictyosomes, indifférenciés, ne sont pas apparemment fonctionnels. L'épaississement très important de la paroi paraît donc dû à une activité spécifique et très intense du plasmalemme. Le cytoplasme, ou les organites, ne semblent pas participer de façon visible à son élaboration.

Ces cellules denses à paroi épaisse paraissent représenter les cellules albumineuses primitives, contemporaines du protophloème, avec lequel elles sont en relation par des perforations pariétales. Les cellules plus vacuolisées constituent un parenchyme albumineux dont l'activité fonctionnelle est probablement moins intense. Le caractère le plus apparent des cellules albumineuses est sans doute constitué par les ribosomes très nombreux, très denses, parfois regroupés ou disposés en hélice (Pl. 42, b).

A la même époque et au même niveau, on observe que coexistent des cellules albumineuses fonctionnelles qui diffèrent entre elles par leur richesse en ribosomes (Pl. 41 et 42). Il s'agit probablement là de stades évolutifs ; la cellule initialement très dense, s'éclaircit progressivement par disparition du matériel ribosomal. Peu de cellules albumineuses différenciées coexistent, de la même façon que peu d'éléments criblés sont simultanément fonctionnels ceux du protophloème dégénérant tandis que mûrissent ceux du métaphloème.

Au bout d'un temps assez bref de fonctionnement, ces cellules se nécrosent, et ce processus paraît être précédé d'une désorganisation des ribosomes responsables de l'activité cellulaire. On note l'apparition de "microparticules"

déjà décrites dans les cellules adultes, et qui correspondent probablement à des sous-unités ribosomales en cours de dispersion. La totalité des cellules de ce type ont disparu lorsque se mettent en place les premiers éléments de métaphloème.

La cellule albumineuse I est donc une cellule peu différenciée à paroi épaissie et riche en ribosomes.

Le tissu albumineux qui apparaît ultérieurement provient également d'initiales méristématiques indifférenciées. Au cours de leur évolution, elles passent par les étapes évoquées ci-dessus mais aboutissent à un degré plus élevé de différenciation.

5.2.3. Différenciation des cellules albumineuses II, contemporaines du métaphloème

On peut distinguer, dans les cellules qui apparaissent au contact ou à proximité immédiate du métaphloème, les deux types cellulaires déjà décrits (Pl. 43, a, c, d). Les cellules "claires" se caractérisent par une vacuolisation très poussée. Les mitochondries, peu nombreuses, possèdent des tubules internes caractéristiques (Pl. 43, c). Le système lamellaire des plastes est peu développe ; ils sont le plus souvent amylifères. Le cytoplasme est clair, pourvu d'un réticulum endoplasmique granulaire peu différencié. Dans les cellules denses, au contraire, la teneur en ribosomes est très élevée et la vacuolisation réduite (Pl. 43, a et d). Le réticulum endoplasmique est le plus fréquemment granulaire.

Dans les deux cas cependant, on note la présence au sein du cytoplasme de dictyosomestrès actifs (Pl. 43, b) qui élaborent en grand nombre des vésicules golgiennes de taille et d'aspect variés. Ces vésicules apparaissent fréquemment étoilées, entourées d'un feutrage filamenteux ("spiny vesicles "), ou bien en forme de cupules (Pl. 44, d et f). Ces vésicules migrent dans le cytoplasme et sont finalement incorporées dans la paroi par l'intermédiaire du plasmalemme. Il n'est pas rare de rencontrer de tels aspects d'abouchement et d'incorporation dans lesquels la membrane plasmique joue certainement un rôle important (Pl. 44, e). Les corps multivésiculaires observées (Pl. 44, a) pourraient constituer une forme de transit. On comprend donc qu'à cette phase d'intense activité golgienne corresponde un appréciable accroissement en épaisseur de la paroi (120).

On constate par ailleurs que les plasmodesmes s'allongent, se divisent quelque peu, et surtout, à leur niveau, la paroi subit des épaississements qui correspondent aux épaississements fusiformes observés en microscopie optique (Pl. 43, b et Pl. 44, b). Ces accroissements localisés de la paroi paraissent cependant se réaliser indépendamment de la production golgienne, car on n'observe pas à leur niveau de figures d'incorporation de vésicules. Il semble donc bien que la formation des expansions plasmodesmiques soit surtout le fait d'une activité propre du plasmalemme cellulaire, et des systèmes membranaires qui lui font suite dans le plasmodesme.

Si l'on admet cependant que les cellules de STRASBURGER jouent un rôle dans la translocation des solutés, il ne semble pas que cette possibilité soit uniquement le fait des plasmodesmes. On observe en effet en de nombreux endroits des décollements du plasmalemme, qui constitue à l'intérieur du cytoplasme des

ampoules remplies d'un matériel (Pl. 43, fig. d) peu dense. Ces aspects suggèrent qu'intervient également un transfert pinocytique des substances hydrosolubles. Ce mécanisme assure la diffusion rapide de grande quantité de liquides sous forme de vésicules qui s'abouchent au tonoplaste vacuolaire et s'incorporent finalement au vacuome cellulaire. Il n'est pas aisé de distinguer les aspects d'incorporation de vésicules golgiennes et ceux qui suggèrent un transfert pinocytique des solutés. Il semble cependant que les expansions importantes du plasmalemme dans le hyaloplasme ou les vacuoles diffèrent sensiblement,sur le plan morphologique, des vésicules membranaires (plasmalemmasomes) impliquées dans l'édification de la paroi.

La cellule albumineuse II a donc une paroi assez épaisse, partiellement d'origine golgienne , pourvue localement d'expansions plasmodesmiques (Pl. 46, e). Le cytoplasme est dense, le réticulum endoplasmique rugueux bien développé. Les décollements du plasmalemme correspondent apparemment à un passage pinocytique des substances hydrosolubles.

Là encore cependant, divers aspects cellulaires coexistent (Pl. 46, a), qui suggèrent une évolution progressive des cellules albumineuses en rapport avec le métaphloème. Après une phase d'intense activité, caractérisée par un aspect cellulaire particulièrement dense (Pl. 45), le cytoplasme s'éclaircit, les corps de Golgi sont beaucoup moins actifs (Pl. 46, b), les ribosomes font place à des microparticules (Pl. 46, d) et on peut observer, dans le cytoplasme clair, des fibres cytoplasmiques (Pl. 46, c).

Structure des cellules périphériques

A la même époque, les cellules qui ne sont pas en relation avec les éléments criblés (cellules albumineuses II non fonctionnelles) présentent des caractères infrastructuraux légèrement différents.

Autour du noyau central, volumineux (Pl. 47), les vacuoles sont nombreuses mais de petite taille. Le réticulum endoplasmique, développé à la périphérie, apparaît constitué de profils lisses ou faiblement granulaires (Pl. 48, b). Les corps de Golgi sont peu nombreux et peu actifs.

Les plastes possèdent tous un grain d'amidon placé en position centrale entre deux thylacoïdes aplatis. Le système lamellaire est très peu développé et il n'y a pas d'empilements granaires. On observe par contre que le stroma plastidal, autour du grain d'amidon, renferme un réticulum périphérique tubulaire très développé (Pl. 48, a).

Les ribosomes ont une répartition très homogène. Ils sont libres ou regroupés en petits polysomes ; il existe des ribosomes "en hélice" (Pl. 48, c). On observe enfin, parfois, des formations denses (Pl. 48, a), de signification inconnue. La paroi est d'épaisseur moyenne et possède très peu de plasmodesmes. Ces cellules ne sont donc pas méristématiques mais ne présentent pas non plus la différenciation cellulaire des cellules adultes. Elles constituent un stade intermédiaire caractérisé par les plastes non chlorophylliens mais amylifères.

Ces cellules vont progressivement prendre la place des cellules albumineuses précédemment différenciées qui se nécrosent, nous l'avons vu, en même temps que les éléments du métaphloème qui leur sont contigüs (Pl. 50).

### 5.2.4. Maturation des cellules albumineuses III et formation des cellules définitives

La transformation de cellules albumineuses III en cellules de STRASBURGER adultes concerne surtout les aspects suivants :

- accroissement volumétrique des cellules et modification de leur forme ;
- épaississement de la paroi et constitution d'expansions plasmodesmiques différenciées ;
- dédifférenciation du plastidome ;
- évolution du cytoplasme fondamental et des ribosomes.

1. Expansion cellulaire

En une quinzaine de jours la taille des cellules de STRASBURGER augmente considérablement et elles atteignent leurs dimensions définitives. Elles n'apparaissent plus polyédriques mais s'arrondissent et présentent des contours plus flexueux. L'accroissement des cellules albumineuses et leurs modifications morphologiques sont rendues possibles par l'écrasement des cellules II dont le contenu disparait, et qui, réduites à un simple squelette pariétal, n'opposent que peu de résistance à la poussée des cellules avoisinantes. La morphologie définitive des cellules est assez variable, ce qui apparaît sur les coupes longitudinales d'aiguille adulte. Cela tient tant aux dimensions initiales de la cellule qu'aux possibilités de réarrangement dont elle a pu bénéficier.

2. Epaississement de la paroi. Formation d'expansions plasmodesmiques

L'accroissement en épaisseur de la paroi est dû initialement, on l'a vu, à l'activité des dictyosomes. Il est probable cependant que l'élaboration intense de vésicules golgiennes n'est qu'un phénomène transitoire, car dans les cellules en cours de maturation, les corps de Golgi apparaissent rapidement peu actifs. La formation de la paroi définitive et en particulier de la couche la plus interne, dense, résistante à l'extraction enzymatique, paraît être le fait d'une activité propre du plasmalemme. On observe en effet un ralentissement très sensible de l'activité golgienne (Pl. 49, d et e) alors que la paroi continue à s'épaissir à peu près aussi vite (en particulier lors de la formation de la couche interne dense et des expansions plasmodesmiques).

On constate que le système plasmodesmique se complique progressivement par allongement et bifurcation des desmotubules constitutifs ; la charpente pariétale est vraisemblablement édifiée au fur et à mesure par le plasmalemme limitant le plasmodesme.

3. Plastidome

Dans les cellules albumineuses II les plastes assez allongés possédaient quelques thylacoïdes disposés dans l'axe du plaste et, le plus souvent, un volumineux grain d'amidon.

Les plastes perdent leur forme ovoïde, fusiforme, et deviennent généralement sphériques. Les thylacoïdes, initialement disposés dans le grand axe du plaste restent en position centrale. Ils sont minces, dépourvus d'empilements granaires. Le réticulum périphérique prend un grand développement et envahit progressivement la totalité du plaste. Le grain d'amidon disparait ou persiste sous forme très réduite au centre du plaste (Pl. 49, b).

Il y a donc transformation de leucoplaste ovoïdes amylifères en leucoplastes sphériques non amylifères, avec développement concomittant du réticulum périphérique.

4. Vacuome

L'accroissement du volume vacuolaire (Pl. 49 a et c) se réalise aux dépens du cytoplasme qui est autolysé ; cette digestion s'accompagne de la formation de"c ps plurilamellaires"caractéristiques (Pl. 49, c) dans lesquels on discerne les restes du matériel ribosomal non encore désagrégé.

5. Evolution du cytoplasme

Quelle que soit la densité initiale des cellules albumineuses en ribosomes, ces derniers ont tendance à se regrouper puis, ultérieurement,à se désorganiser. Le processus de regroupement est particulièrement clair dans les cellules riches en ribosomes où ceux-ci constituent de gros amas indépendants les uns des autres entre lesquels on discerne la trame hyaloplasmique (Pl. 45, 52). Leur désorganisation est liée à l'apparition de "microparticules" déjà évoquées à plusieurs reprises. A proximité des amas de ribosomes, on observe des structures de très petite taille, elles-mêmes le plus souvent regroupées. Ces microparticules ont déjà été décrites dans les cellules adultes (p. 42). Rien ne permet d'affirmer cependant qu'il s'agit là d'un processus nécrotique. Les cellules peuvent apparemment vivre longtemps avec un hyaloplasme très clair, sans qu'intervienne une dégénérescence quelconque (Pl. 53, b). Nous pensons qu'il s'agit là d'une modification de la fonction des cellules albumineuses et que l'on peut établir un parallèle entre l'évolution de ces cellules et celle des éléments criblés. Il semblerait que dans un premier temps, le rôle joué par les cellules de STRASBURGER implique une forte activité ribosomale. L'évolution ultérieure de leur physiologie (dans un sens conducteur ?) se traduirait par une désorganisation progressive du matériel ribosomal initialement présent.

Parmi les modifications infrastructurales subies par les cellules albumineuses III en cours de maturation, il faut signaler l'isolement de vastes territoires cytoplasmiques délimités par des profils superposés de réticulum lisse (Pl. 53, a) et la multiplication des canalicules de réticulum lisse ou rugueux au sein de la masse cytoplasmique (Pl. 53, c).

5.2.5. Incorporation au tissu de transfert de cellules secondaires

Les cellules albumineuses internes IV d'origine secondaire apparaissent immédiatement contre le cambium des faisceaux (Pl. 51, a). Elles possèdent initialement un cytoplasme dense, un réticulum granulaire et des plastes agranaires. Le vacuome, initialement peu important, se développe rapidement et les cellules prennent alors l'aspect qu'elles possèdent au stade adulte (Pl. 51, b) : la plus grande partie de la cellule est occupée par une vacuole centrale, à contenu finement structuré, qui paraît s'agrandir aux dépens du cytoplasme pariétal. Dans les cellules fonctionnelles, ce dernier ne constitue plus qu'une mince lame appliquée contre la paroi, parcourue de travées de réticulum granulaire (Pl. 52, a). Peu après le tonoplaste s'atténue (Pl. 52, b) puis disparaît. Il n'est plus possible alors de discerner les limites de la vacuole, qui ne constitue plus qu'une seule phase avec le cytoplasme cellulaire. Ces aspects sont peut-être cependant artéfactiques et liés à une très grande fragilité de la membrane tonoplastique, difficile à conserver par la méthode de fixation utilisée (Pl. 52, c). A ces dernières étapes correspond la formation d'expansions du plasmalemme dans la vacuole, puis dans la cavité cellulaire. Ces ampoules renferment en leur sein des sphères de taille variable. Nous pensons qu'il s'agit là d'aspects de transfert pinocytique des solutés aqueux. Ce mode de transport semble pouvoir intervenir dans des cellules encore plus évoluées (Pl. 52, d), à cytoplasme clair fortement modifié.

5.2.6. Cas particulier des cellules chlorophylliennes

Elles sont issues de la différenciation de cellules de méristème primaire située à la périphérie contre le méristème de transfusion et ne présentent aucune communication immédiate avec le phloème.

La paroi passe par les différentes phases d'accroissement observées dans les cellules médianes, sans formation cependant d'expansions plasmodesmiques. Le cytoplasme se creuse de vacuoles de grande taille ; les ribosomes, répartis de façon très homogène, bordent localement les profils de réticulum granulaire. Les dictyosomes ne paraissent actifs qu'à un certain stade de l'évolution des cellules. On observe en outre dans le cytoplasme des mitochondries bien développées et des corps multivésiculaires.

La principale transformation subie par ces cellules porte sur l'équipement plastidal. Le système lamellaire se développe et constitue tout d'abord des empilements parallèles (Pl. 5[illegible], a) dans lesquels se différencient ultérieurement des saccules granaires (Pl. 5[illegible], b). A la périphérie du plaste se développe en outre un réticulum périphérique tubulaire, qui est probablement en relation avec le système lamellaire. Le stroma est dense. Les chloroplastes ainsi constitués peuvent devenir amylifères.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

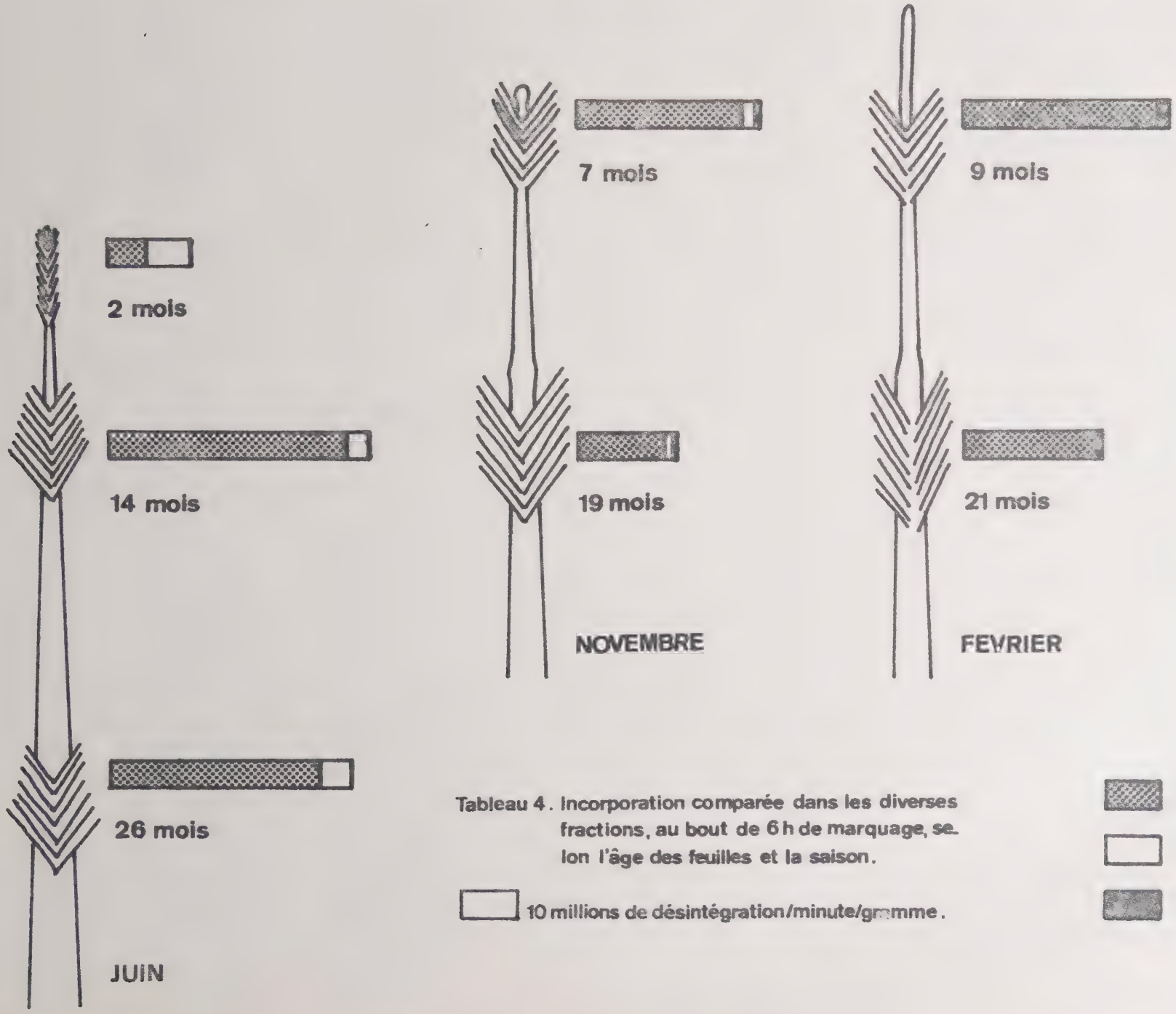



Tableau 4. Incorporation comparée dans les diverses fractions, au bout de 6 h de marquage, selon l'âge des feuilles et la saison.

10 millions de désintégration/minute/gramme.

# CHAPITRE VI - ETUDE AUTORADIOGRAPHIQUE DE L'INCORPORATION DU $^{14}CO_2$ DANS LES AIGUILLES DE *PINUS PINASTER*

Quelle que soit la saison, la photosynthèse est un phénomène très actif et l'incorporation du $^{14}CO_2$ dans les aiguilles se réalise rapidement.

L'analyse chimique permet de quantifier de façon précise l'incorporation "instantanée" au bout de 1 h 30 et 6 heures, et les fractions biochimiques auxquelles est associé le carbone marqué. Les valeurs obtenues pour cette incorporation instantanée ne sont pas absolument comparables car, on le verra, au bout de 6 heures en juin, une partie appréciable du marquage a déjà migré. Les dosages au scintillateur permettent également de suivre la progression des métabolites dans le rameau long et le sens de leur migration en fonction de la saison.

L'étude autoradiographique, effectuée uniquement sur les aiguilles, complète utilement ces informations. Elle permet d'apprécier les sites cellulaires dans lesquels s'incorporent préférentiellement les métabolites marqués, leur progression vers les éléments conducteurs par lesquels ils migrent dans le rameau, les modalités d'accès aux éléments criblés, de leur conduction longitudinale et de leur redistribution. Nous n'avons procédé qu'à une évaluation approximative de la densité des grains d'argent produits, l'autoradiographie quantitative étant soumise à de nombreux impératifs difficiles à respecter dans le cas de notre matériel.

## 6.1.- INCORPORATION INSTANTANEE

Le tableau 4 ci-contre rend compte de la quantité de carbone radioactif incorporé au bout de 6 heures en fonction de la saison et de l'âge des aiguilles. C'est le temps au bout duquel est réalisée l'incorporation maximale (¤).Elle est plus importante pour les feuilles de l'année entièrement développées, plus réduite pour les feuilles plus âgées et relativement faible pour les aiguilles en croissance.

Le taux d'incorporation est plus élevé en juin qu'en février et en novembre.

## 6.2.-FRACTIONS BIOCHIMIQUES MARQUEES

Pour deux séries d'expériences ont été distinguées trois fractions :

- hydrosolubles (glucides, acides aminés)
- "lipides" (fraction soluble dans le chloroforme)
- hydrolysables (mesure des sucres solubles obtenus après hydrolyse chlorhydrique).

---

(¤) Anne MARPEAU-BEZARD a effectué les calculs, conçu et réalisé les tableaux qui accompagnent ce chapitre. Nous l'en remercions très vivement.

Le dosage de la fraction "hydrolysable" (amidon, constituants pariétaux) n'a pas été réalisé en février. L'évolution respective des diverses fractions marquées, en fonction de la saison, est reportée dans le tableau 5 ci-joint.

En toutes saisons la plus grande partie du carbone radioactif s'incorpore à la fraction essentiellement glucidique soluble dans l'eau. Au mois de juin les substances hydrolysables marquées sont assez abondantes, surtout dans les feuilles de l'année en croissance. Cela est compréhensible, cette période étant celle où l'amylogénèse est la plus intense. En novembre au contraire il y a peu d'amidon marqué dans l'aiguille. L'importance de la fraction lipidique marquée , qui est très réduite en juin, croît au contraire en période hivernale. Ceci confirme les observations antérieures qui ont montré que la mise en réserve des produits de la photosynthèse sous forme assez stable (amidon, lipides) se réalise différemment selon la saison : elle est directement contrôlée par la température et par l'ensoleillement.

6.3.-INFLUENCE DES MODALITES DE FIXATION.

Les deux techniques de fixation utilisées fournissent des résultats sensiblement équivalents en ce qui concerne la densité totale des grains d'argent finalement mis en évidence, avec un léger avantage cependant pour la méthode au méthanol saturé d'hydroxydes de baryum et de strontium. Il ne faut pas perdre de vue cependant que les produits conservés in situ diffèrent assez largement. Après fixation glutaraldéhyde/osmium, on peut estimer que la totalité des produits hydrosolubles sont perdus et une partie de la fraction lipidique. Seuls les polyeptides assez volumineux pour contracter des liaisons stables avec le glutaraldéhyde, l'amidon et les parois sont intégralement conservés. On observe cependant après cette fixation un marquage intravacuolaire très net (Pl. 55, b). Le métharol dissout au contraire la totalité des inclusions lipidiques et pourtant le marquage observé est au moins égal à celui obtenu avec la technique précédente. Il faut donc admettre qu'une partie au moins de la fraction hydrosoluble est maintenue in situ, très inférieure cependant à la quantité totale incorporée sous cette forme majoritaire, comme le montrent les tableaux d'incorporation et les extractions comparatives sur blocs que nous avons effectuées et mesurées au compteur à scintillation. Quoiqu'il en soit on ne peut conclure que cette méthode résout parfaitement le problème du maintien complet, in situ, des oses et des acides aminés, malgré le soin apporté pour éviter tout contact avec l'eau. Outre la dissolution partielle des produits intervient probablement un entrainement mécanique appréciable. Ce problème n'est pas nouveau (214); mais les auteurs qui se sont penchés récemment sur le problème de l'observation microscopique de la translocation des métabolites hydrosolubles dans le phloème concluent à la nécessité de techniques plus "sophistiquées" : cryo-dessiccation et siliconisation des tissus avant infiltration et emploi d'émulsion sensible sous forme de "stripping-film" (96, 200).

6.4. - LOCALISATION INTRACELLULAIRE DANS LES AIGUILLES DES PRODUITS MARQUES.

Bien que l'incorporation ne soit pas complète au bout d'1 h 30 en juin, on constate qu'au bout de ce délai tous les tissus extérieurs au faisceau cribro-vasculaire contiennent une proportion appréciable de produits radioactifs.

Dans l'épiderme et le sous-épiderme, l'incorporation est nulle sauf pour les feuilles en croissance. On constate en effet pour les feuilles de l'année (3 mois) un marquage massif des tissus de revêtement, qui concerne aussi bien la paroi, en cours d'épaississement accéléré que le cytoplasme responsable de cet accroissement (Pl. 54, c). Ceci montre bien que ces tissus, et en particulier l'épiderme, subissent une évolution très rapide au cours de la formation

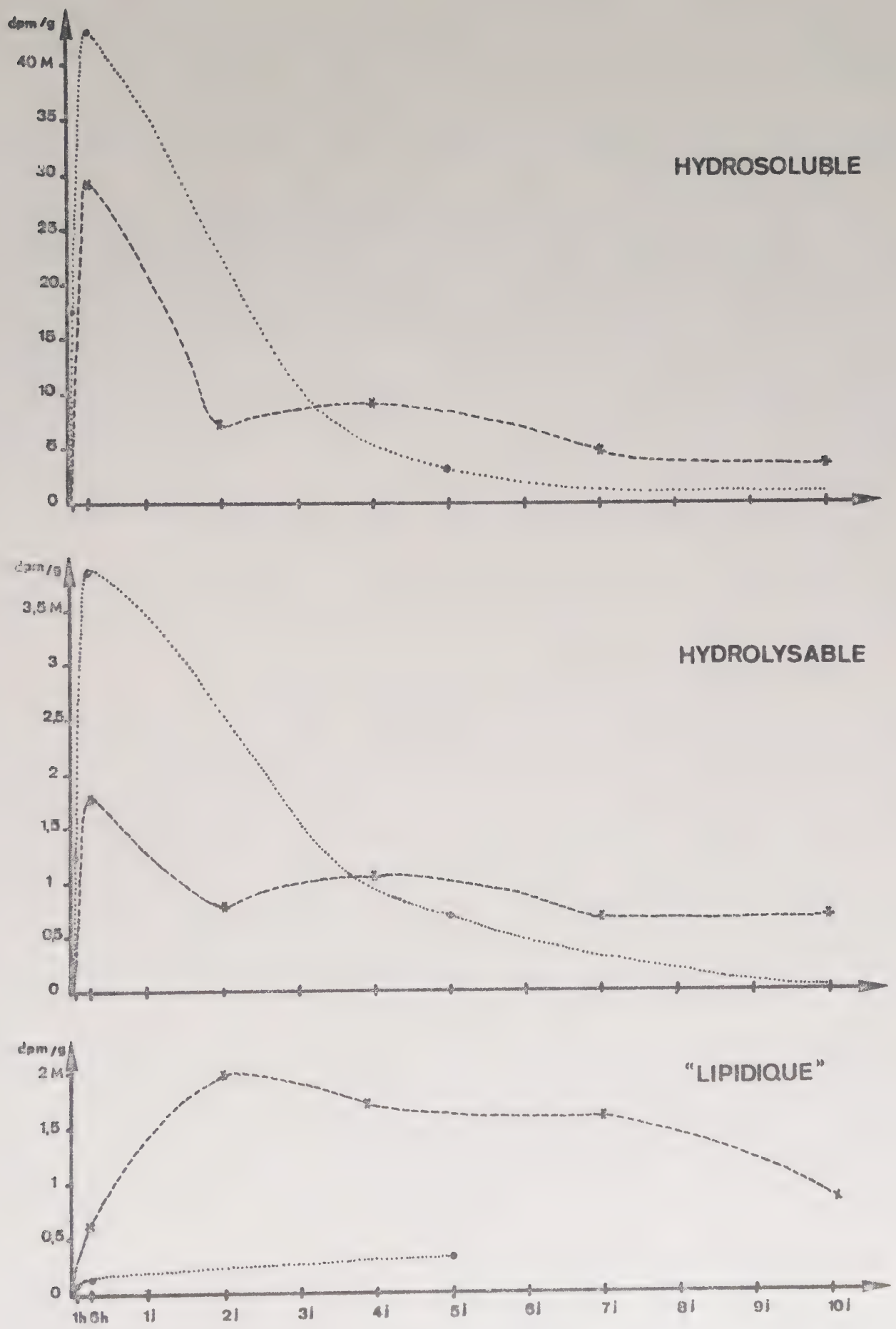



Tableau 5. Cinétique d'incorporation de $^{14}C$ selon les fractions biochimiques en juin (···) et en novembre (---), en millions de désintégration par minute et par gramme (M dpm/g).

de l'aiguille mais que les cellules constitutives ne réalisent plus de photosynthèse au bout d'un délai très bref.

Dans le chlorenchyme périphérique, le marquage se répartit sur tout le cytoplasme et sur le noyau,on note également une incorporation sensible dans les grandes vacuoles polyphénoliques (Pl. 54, a et b).

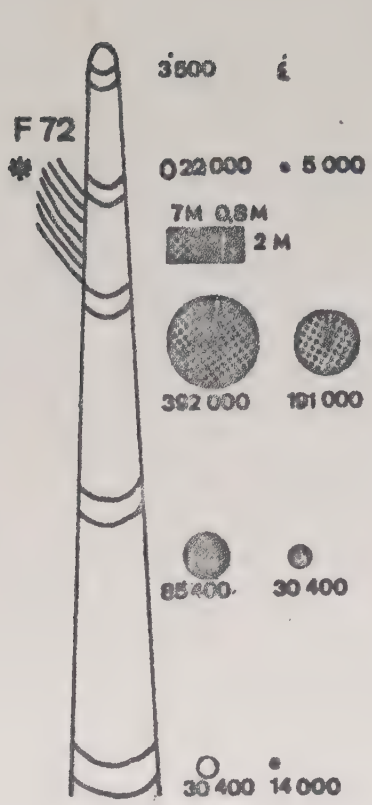
L'endoderme et les cellules parenchymateuses du tissu de transfusion ne retiennent qu'une part modérée du carbone photosynthétique en juin (marquage léger de l'amidon) et en novembre (marquage de vacuoles tannifères des cellules de transfusion). En période hivernale la fraction des gouttelettes lipidiques conservées par la fixation est également assez fortement marquée. En ce qui concerne ces tissus parenchymateux le phénomène le plus intéressant se produit au mois de février. L'endoderme et les cellules parenchymateuses de transfusion ne contiennent alors que de très petits grains d'amidon. Ces amyloplastes de taille réduite préludent à la réalisation d'une amylogénèse intense pendant le printemps. On constate cependant que ces petits grains sont très intensément marqués, bien plus que l'amidon d'été pourtant plus volumineux (Pl. 54, e). On peut en conclure que l'élaboration de nouveaux grains d'amidon à la fin de l'hiver se réalise presque exclusivement à partir des produits de la photosynthèse, ce qui explique la concentration du carbone marqué à leur niveau. Au mois de juin au contraire, et à un moindre degré au mois de novembre, les amyloplastes contiennent peu de carbone radioactif : malgré leur taille, ils constituent alors très probablement, non une forme d'accumulation des métabolites photosynthétiques, mais une forme de rotation. A leur niveau paraît s'effectuer un "turn-over" du marquage incorporé dans l'aiguille par l'activité des chloroplastes.

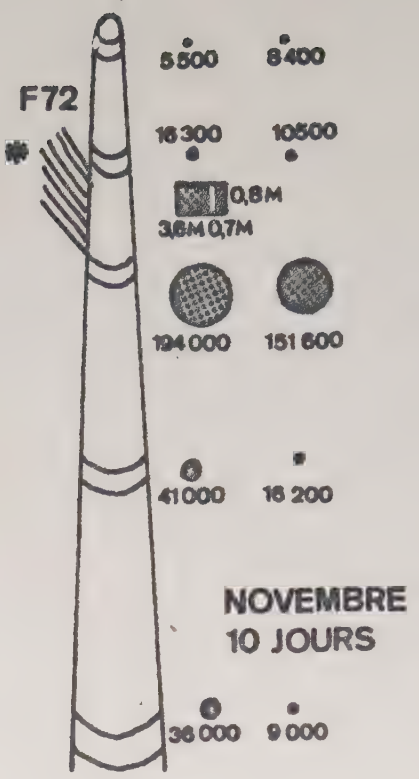
6.5.- ACCES DU MARQUAGE AU TISSU DE TRANSFERT ET AU PHLOEME.

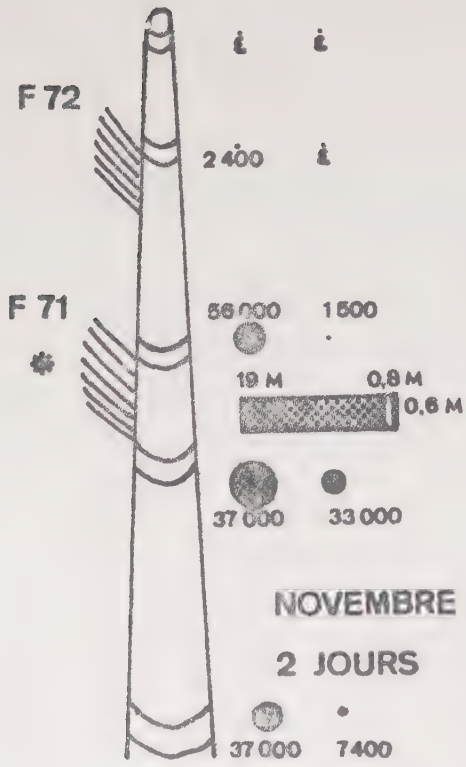
Au bout d'1 h 30 en juin (Pl. 54, g), 6 h en novembre et en février (Pl. 54, f et Pl. 55, c), la partie périphérique chlorophyllienne du tissu de transfert (comme les tissus chlorophylliens externes) a emmagasiné une quantité appréciable de carbone radioactif. Dans le même délai, les parties plus internes ne sont pas marquées. Cela signifie donc qu'il y a, comme pour les autres tissus verts de l'aiguille (chlorenchyme, cellules parenchymateuses de transfusion) fixation directe du $^{14}CO_2$ par les chloroplastes (sous forme gazeuse ?) (Pl. 55, a). Ultérieurement, c'est-à-dire au bout de 6 h en été (Pl. 55, c et d) et d'une douzaine d'heures en hiver (Pl. 55, f), on observe des grains d'argent dans la totalité des cellules albumineuses, et ce marquage ne peut alors être lié qu'aux fractions protéique. (noyau, cytoplasme) et lipidique après fixation glutaraldéhyde/osmium. Il y a donc déjà eu transformation du $^{14}C$ et incorporation dans des molécules plus lourdes.

La pénétration des éléments marqués dans le phloème se réalise par l'intermédiaire du tissu de transfert mais également par la totalité des cellules parenchymateuses vivantes contiguës au phloème (Pl. 55,h). Les métabolites qui transitent par les cellules de STRASBURGER pénètrent préférentiellement dans le faisceau par la zone cambiale, et à un moindre degré par les parois contiguës au phloème différencié. Les éléments marqués provenant des cellules parenchymateuses accèdent aux éléments criblés par la face abaxiale, ou la face interne du faisceau, et le transfert se réalise par l'intermédiaire des éléments non conducteurs comprimés du phloème ancien.

On constate dans les feuilles adultes une concentration particulière des métabolites dans le tissu de transfert par rapport aux autres éléments parenchymateux. Ceci correspond à une accumulation, liée peut-être à une transformation de ces métabolites. Par contre, dans les feuilles en croissance, le nombre des grains d'argent est très réduit dans le tissu de transfert. Ceci suggère que, dans ce cas, les métabolites ne font que transiter rapidement à ce niveau (Pl. 65, c).




M dpm/g dans la fraction hydrosoluble
M dpm/g dans la fraction hydrolysable
M dpm/g dans la fraction "lipidique"
0,1 M dpm/g ayant migré
corce + liber ; à dr. bois
uilles placées en atmosphère enrichie en $^{14}CO_2$

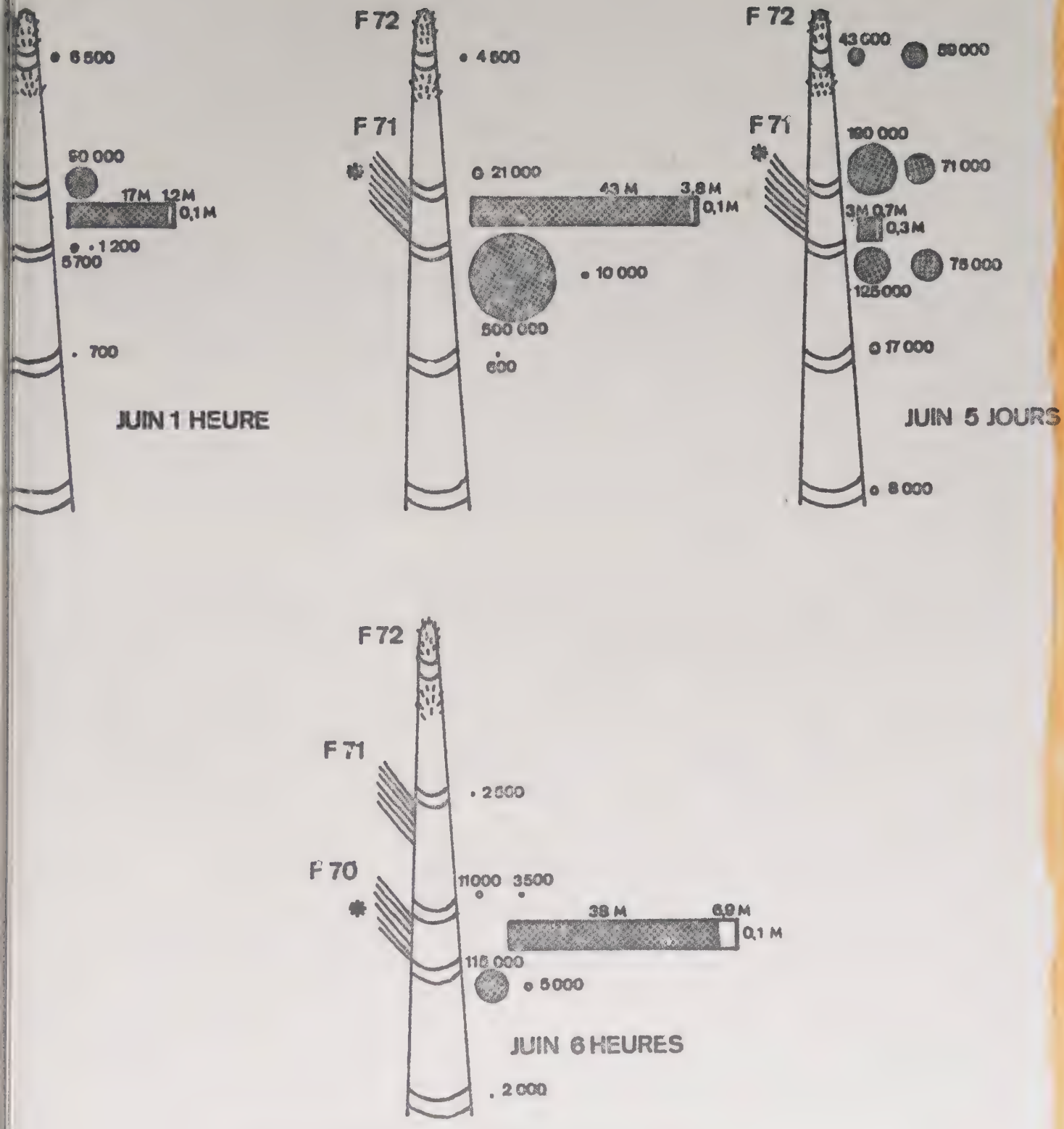



**Tableau 6.** Incorporation dans les aiguilles et migration dans le tronc en fonction de la saison et de la durée de maintenance <u>in situ</u> des aiguilles.

Quelle que soit la saison, on constate que les éléments radioactifs parviennent, dans les feuilles adultes, à l'ensemble des éléments criblés morphologiquement différenciés et des cellules de parenchyme vertical quel que soit leur âge. Il n'y a aucune concentration particulière dans les éléments criblés les derniers formés (Pl. 55, g et i). On peut donc admettre que, en toute saison, tous les éléments constitutifs du phloème sont à même d'assurer la translocation latérale des métabolites. Il n'en est pas de même dans les feuilles en cours d'allongement où le marquage se concentre à proximité de la zone cambiale, dans les éléments criblés les derniers formés.

6.6. - MIGRATION LONGITUDINALE.

Elle s'effectue en toute saison par l'intermédiaire des éléments criblés. Le tissu de transfert n'a pas directement un rôle conducteur et on ne peut retrouver la moindre trace de marquage dans le tissu de transfert de la base de l'aiguille à un moment où le brachyblaste contient une partie appréciable du carbone incorporé dans l'aiguille. Dans les feuilles adultes, la conduction, toujours centripète, se fait par l'ensemble des tubes criblés de l'année (Pl. 56, b et c). Mais à la base de l'aiguille, seuls les élèments criblés les plus internes sont concernés par la translocation (Pl.56, a). Les métabolites circulant initialement dans la totalité du phloème subissent donc une migration basipète oblique qui entraine une concentration particulière au centre de l'aiguille. On ne voit pas clairement à quoi peut correspondre ce phénomène de "balayage" du phloème ; il contribue peut-être à une homogénéisation des contenus des divers éléments criblés.

Dans les feuilles en cours d'accroissement, la conduction longitudinale se réalise au contraire exclusivement par l'intermédiaire du procambium ou de la zone cambiale et de la dernière assise d'éléments criblés formés (Pl. 56, d). Le phloème plus ancien ne joue aucun rôle.

La vitesse à laquelle s'effectue la migration est naturellement variable selon les saisons. Elle est fonction de divers facteurs : ensoleillement et température élevée favorisant l'activité photosynthétique, appel des bourgeons, poussée radiculaire, etc... On constate qu'au mois de juin le brachyblaste est fortement marqué au bout de 6 h. On n'obtient en novembre et février une densité de grains comparable qu'au bout de 24 h.

6.7. - DEVENIR DES PRODUITS MARQUES DANS L'AIGUILLE ET LE RAMEAU COURT.

Outre leur participation aux activités de croissance de l'arbre, les produits issus de la photosynthèse participent directement au métabolisme des parties non chlorophylliennes de l'aiguille et du rameau court. On constate en effet la persistance prolongée du marquage dans les aiguilles, incorporé dans diverses fractions. On peut en suivre l'évolution (Tabl. 5). On constate en effet au fil des jours une accumulation très importante de substances radioactives dans le rameau court. Ces produits drainés par l'activité de conduction des éléments criblés diffusent très rapidement dans le système des rayons (Pl. 56, f et g). Le support préférentiel du marquage dans les cellules des rayons est représenté par l'amidon en juin, par des lipides en hiver (Pl. 56, h).

Par l'intermédiaire du système horizontal des rayons et par le biais d'une réaction en chaîne se réalise une redistribution massive des produits marqués. Ainsi observe-t-on, au bout de 7 jours en novembre, une accumulation du $^{14}C$ dans le parenchyme médullaire, par l'intermédiaire des rayons du bois (Pl. 56, i), et dans le parenchyme cortical, par le canal des rayons du phloème. Le système horizontal des rayons paraît donc jouer un rôle prépondérant dans la redistribution latérale, au niveau des axes, des produits issus de l'activité photosynthétique des feuilles.

6.8. - MIGRATION DES METABOLITES DANS LA TIGE.

La plus grande partie du carbone radioactif passe cependant dans la tige. La proportion relative du $^{14}CO_2$ incorporé par les aiguilles et celui retrouvé dans le rameau long varie cependant avec l'âge des feuilles. Les résultats détaillés de cette étude figurent dans le tableau 6. Ils permettent de tirer les conclusions suivantes :

- les jeunes feuilles en élongation conservent la plus grande partie du carbone photosynthétique pour les besoins de leur propre croissance et il est significatif à cet égard de constater l'importance de l'incorporation périphérique (épiderme, sous-épiderme) et de la migration vers le méristème basal.
- les feuilles adultes éliminent au contraire la plus grande partie des substances radioactives, mais la migration est moins importante pour les feuilles plus âgées. Ce sont donc, en novembre et février, les feuilles de l'année, et en juin, les feuilles de l'année précédente qui participent le plus intensément au métabolisme général de la plante.

Selon la saison la direction dans laquelle s'effectue la migration des métabolites est variable.

- en juin, on observe tout d'abord une migration descendante, importante mais brève en direction des racines ; puis au bout de quelques jours ce mouvement s'inverse et s'effectue essentiellement en direction du bourgeon apical et des ébauches foliaires en croissance.
- en période hivernale la grande majorité des métabolites photosynthétiques est appelée par le système radiculaire ; la migration apicale est très réduite. Selon la saison, et à la même époque selon la période considérée, la migration libérienne peut être ascendante ou descendante. Ce phénomène a déjà été décrit à plusieurs reprises chez des espèces diverses (215).

6.9. - EVOLUTION ULTERIEURE DANS L'AIGUILLE.

Au moment du dernier prélèvement, pour chaque expérimentation, il persiste une quantité notable de carbone radioactif dans les aiguilles.

Il est probable qu'une partie au moins restera fixée in situ, intégrée dans des structures cellulaires peu mobiles. Le reste migre progressivement vers la base et le rameau long. A cet égard, le tissu de transfert, dans lequel persiste longuement un marquage appréciable (Pl. 56, e) paraît jouer un rôle de régulation dans la diffusion des solutés vers les éléments criblés. Après une période de migration libérienne massive, on observe un relâchement lent des éléments marqués depuis les cellules de STRASBURGER vers le phloème.

6.10. - CONCLUSION.

Les aiguilles du Pin maritime ont une activité photosynthétique permanente, surtout intense en juin. Les aiguilles adultes de 7 à 15 mois ont une capacité d'incorporation plus élevée que les aiguilles plus âgées ou plus jeunes. Le carbone marqué s'incorpore essentiellement, dans l'aiguille, dans la fraction hydrosoluble. La formation de lipides à partir du $^{14}CO_2$ est surtout active en hiver ; la production d'amidon est liée à un rythme saisonnier. L'amidon se forme tout d'abord essentiellement à partir du gaz carbonique ambiant puis constitue en période estivale une forme de rotation.

Les produits élaborés dans les aiguilles migrent en permanence dans le tronc par l'intermédiaire de l'ensemble des éléments criblés de l'année, sauf dans les aiguilles jeunes où seuls les derniers formés sont conducteurs. La migration des photosynthats s'effectue beaucoup plus rapidement en juin qu'en hiver.

Elle est plus active pour les feuilles adultes que pour les feuilles jeunes qui utilisent le carbone fourni pour leurs propres synthèses. Les feuilles plus âgées fournissent moins de métabolites au reste de l'appareil végétatif. Ceci peut-être relié d'une part à une diminution d'activité des chloroplastes - que l'on peut estimer par la capacité d'incorporation instantanée - d'autre part à une diminution du nombre des éléments criblés fonctionnels, en rapport avec une réduction des potentialités de cloisonnement de la zone cambiale.

Les métabolites parviennent au phloème par l'ensemble des cellules parenchymateuses qui l'entourent. Le tissu de transfert ne paraît pas avoir un rôle préférentiel dans l'accumulation de ces produits. Il semble jouer un rôle cependant dans la rétention et le relâchement des métabolites dans le phloème. Dans les feuilles jeunes, les cellules de STRASBURGER constituent uniquement un lieu de transit rapide. Le tissu de transfert n'est pas concerné directement par la conduction longitudinale des métabolites.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

## CHAPITRE VII -DISCUSSION

## PARTICULARITES DES CELLULES DE STRASBURGER FOLIAIRES

Nous avons montré qu'il existe dans les cellules de STRASBURGER de l'aiguille du Pin maritime une différenciation morphologique et ultrastructurale en 3 groupes principaux de cellules. HUBER avait observé l'allongement des cellules depuis la périphérie du tissu jusqu'au phloème, mais sans définir de catégories cellulaires distinctes liées à des caractères cytologiques particuliers. Les cellules chlorophylliennes constituent probablement une zone de transition avec les cellules parenchymateuses chlorophylliennes du tissu de transfusion dont elles ne diffèrent surtout que par une taille plus réduite et un vacuome non tannifère. En outre, les cellules internes constituent peut-être les premiers rayons du phloème, comme on l'a déjà suggéré (144) ; elles en possèdent les aspects morphologiques et infrastructuraux. Les cellules internes sont cependant disposées sur 2 ou 3 couches, les rayons n'étant toujours constitués que d'une assise de cellules, de taille légèrement plus réduite. Le massif central de cellules médianes est donc constitué probablement des cellules de STRASBURGER les plus différenciées. Elles représenteraient un type cytologique assez pur dont la spécialisation (cytoplasme et parois) serait plus poussée.

La taille de toutes ces cellules s'allonge de la périphérie du tissu, contiguë aux cellules de transfusion arrondies, vers l'intérieur accolé aux éléments criblés très allongés du phloème.

A cette transition purement morphologique, est lié un gradient de vitalité cellulaire. Dans l'aiguille très âgée, on remarque que la plupart des cellules médianes présentent des signes de désorganisation cytoplasmique accentuée. Il n'en est pas de même pour les cellules chlorophylliennes qui, jusqu'à la chute de l'aiguille, ne présentent dans l'ensemble aucun signe de sénescence.

Les cellules internes présentent, quant à elles, de fortes altérations ultrastructurales qui se manifestent précocement au cours des premiers mois de la vie de l'aiguille. Chez les cellules les plus proches du phloème, la cessation d'activité intervient donc plus tôt que dans celles situés à la périphérie.

La cellule chlorophyllienne constituerait donc dans le tissu albumineux, un élément stable dont la vitalité serait liée à l'état général de l'aiguille et non soumise à un rythme endogène. La cellule médiane paraît présenter de plus grandes capacités évolutives, peut-être en rapport avec le rythme d'activité de l'aiguille. Quant aux cellules internes, on ne peut leur attribuer qu'un rôle fugace dans la vie de l'aiguille, contemporain de la mise en place des premiers éléments du phloème secondaire. Dans l'aiguille adulte de 10 mois, elles sont déjà désorganisées.

L'organisation infrastructurale des cellules de STRASBURGER foliaires présente des analogies avec celle décrite dans les cellules cambiales (265) et les très jeunes éléments criblés (266) chez Pinus strobus par SRIVASTAVA et O'BRIEN. Certains aspects particuliers aux cellules de STRASBURGER méritent cependant une étude plus approfondie : le polymorphisme des plastes, la fréquence des fibres cytoplasmiques et la présence de formations morulaires, qui ne paraît pas avoir été signalée jusqu'à présent. Un autre aspect caractéristique des cellules de STRASBURGER est lié à la présence de nombreux plasmodesmes, regroupés ; leurs rapports avec les systèmes membranaires de la cellule doivent être précisés.

7.1. - LES PLASTES.

La présence au sein d'un même organe de chloroplastes différents dans des tissus très proches, souvent décrite, a pu être reliée dans certains cas à des voies synthétiques différentes (LAETSCH, 1968 ; LAETSCH et PRICE, 1969 ; SLACK, HATCH, GOODCHILD, 1969 ; BISALPUTRA et al., 1969 ; ANDERSON et al, 1971) On a réussi récemment (37) à séparer les deux types de chloroplastes des feuilles de Zea mays à l'aide de gradients de densité. Ici, le développement réduit des grana dans les formes normales correspond à un faible degré de différenciation qui paraît caractéristique des cellules albumineuses; il est en tout cas la règle chez les cellules compagnes (9). Le petit nombre de thylacoïdes granaires suggère que ces organites n'ont qu'une activité photosynthétique réduite, liée à leur position très interne. Cette possibilité est renforcée par la présence d'un réticulum situé à la périphérie du stroma, qui évoque celui des plastes de la gaine foliaire de certaines graminées. Chez Dactylis glomerata en effet, HILLIARD et WEST (1971) observent que dans les lignées à chloroplaste pourvues de réticulum périphérique, le taux de photorespiration est beaucoup plus faible que chez celles où les chloroplastes en sont dépourvues.

Les inclusions denses, limitées par une membrane, présentes dans le stroma du chloroplaste, diffèrent de celles décrites par ailleurs (56, 111, 228, 229, 265, 266). On ne peut les assimiler à des "cristaux protéïques" en raison de leur résistance à la pronase et de leur morphologie. Ces inclusions sont également bien distinctes d'un "stromacentre" comme celui décrit par GUNNING chez Avena sativa. Elles ne paraissent pas constituées d'une accumulation de ribosomes chloroplastiques et diffèrent nettement des inclusions de phytoferritine dont la structure cristalline octaédrique régulièrement ordonnée est très caractéristique (229). Enfin elles ne présentent d'analogie avec aucun des trois types d'inclusions décrits par SRIVASTAVA et O'BRIEN dans le cambium et le phloème secondaire de Pinus strobus. La réaction de THIERY fournit à leur niveau un résultat négatif.

Le réticulum développé garnissant intérieurement les plastes agranaires est morphologiquement comparable à celui situé à la périphérie des chloroplastes. L'association de ces plastes à un élément de réticulum granulaire, garni de ribosomes uniquement sur sa face externe, a déjà été décrite par WOODING et NORTHCOTE (1965) dans les cellules sécrétrices de la tige de Pinus pinea, et chez Acer. Ces plastes "gainés" de forme sphérique, sont également pauvres en lamelles. L'accolement étroit des systèmes membranaires du réticulum et du plaste suggèrerait pour ces auteurs des rapports fonctionnels.

7.2. - FORMATIONS MORULAIRES.

La présence de ces formations particulières dans le cytoplasme des cellules médianes coïncide avec une répartition différente des ribosomes dans ce type cellulaire.

Au lieu d'être isolés et distribués uniformément ou bien partiellement regroupés en rosettes ou en spirales, les ribosomes constituent en effet, on l'a vu, des aggrégats denses entre lesquels apparaît la trame fibreuse du hyaloplasme. Sans les identifier formellement avec des ribosomes ("ribosomallike material"), WOODING (1966) décrit des formations très semblables dans l'élément criblé de Pinus pinea en cours de maturation ; ce phénomène de ségrégation des ribosomes s'accompagne en outre de modifications du réticulum endoplasmique qui, initialement granulaire, n'est surtout constitué à ce stade que de profils lisses ; en fin d'évolution de l'élément criblé, ces masses denses aux électrons finissent par disparaître complètement. Ces observations ne sont pas isolées et on retrouve des faits du même ordre dans d'autres espèces : ils seraient liés "au démarrage des modifications cytologiques conduisant à l'expansion cellulaire".

Dans notre matériel, l'apparition de formations morulaires constitue selon nous un mode différent, ou plus évolué, de regroupement des ribonucléoprotéines cytoplasmiques, auquel participerait de façon active le réticulum endoplasmique. Tout paraît se passer en effet comme si les ribosomes étaient drainés en des points particuliers du cytoplasme, par l'intermédiaire du réticulum granulaire, et constituaient des associations d'aspect morphologique varié. Dans les formations morulaires, au sein desquelles la structure ribosomale n'est plus discernable, cette association paraît s'accompagner d'une certaine dénaturation de l'élément constitutif.

Il n'est pas douteux, en effet, que les ribosomes, dans les cellules médianes, subissent un processus évolutif spécifique dont on retrouve les traces à différents niveaux, et en particulier dans les microparticules déjà décrites plus haut, qui sont d'origine ribosomale.

Dans le type cellulaire parenchymateux classique, représenté par la cellule de STRASBURGER chlorophyllienne, les ribosomes ont une apparence et une répartition normales. Dans l'élément criblé au contraire, on assiste pendant la phase de maturation à un regroupement puis à une disparition des dits ribosomes. Entre ces deux extrêmes, la cellule médiane constitue un type intermédiaire, chez lequel le processus de ségrégation des ribosomes s'arrête à un moment donné de la vie de la cellule sans évoluer jusqu'à son terme, comme dans l'élément criblé. Le degré d'évolution varie d'une cellule à l'autre, mais il est précocement déterminé et ne se modifie plus au cours du vieillissement de l'aiguille jusqu'à la phase de sénescence. Il n'est donc pas lié à l'âge et est indépendant du rythme d'activité propre de l'aiguille, lié aux fluctuations saisonnières.

Cet état intermédiaire des ribosomes, caractérisé par le regroupement et la dénaturation, constitue un trait spécifique des cellules de STRASBURGER médianes. Il situe ces cellules, en ce qui concerne cet aspect infrastructural, à mi-chemin entre la cellule parenchymateuse banale et l'élément conducteur le plus différencié. Les formations morulaires n'en concrétisent qu'une des manifestations morphologiques les plus évidentes.

7.3. - FIBRES CYTOPLASMIQUES.

La présence de fibres cytoplasmiques composées de microfilaments a déjà été signalée à plusieurs reprises chez un certain nombre de types cellulaires, et en particulier,dans les cellules épidermiques et les éléments vasculaires en cours de différenciation du coléoptile d'Avoine par O'BRIEN et THIMANN (203), chez le Haricot par NEWCOMB (201), et, chez les Conifères, dans le cambium de Pinus strobus par SRIVASTAVA et O'BRIEN (265). Dans une revue récente (210), PARTHASARATHY et MÜHLETHALER montrent que la conservation in situ de ces fibres paraît en rapport avec le fixateur utilisé et ses modalités d'emploi. Les conditions les plus favorables pour leur préservation sont réunies lorsqu'on effectue une préfixation aldéhydique à température ambiante, suivie d'un traitement intermédiaire à l'acétate d'uranyle avant action du tétroxyde d'osmium. La déshydratation à froid est souhaitable. Chez les douze espèces étudiées par eux (Cucurbita, Nicotiana, Salix et diverses Palmacées), les fibres cytoplasmiques, constituées de faisceaux de microfilaments, sont situées à la périphérie des cellules en cours d'élongation des tissus vasculaires jeunes, et se trouvent au nombre de 1 à 5 par cellule.

D'un groupe à l'autre, la structure des fibres est très comparable, ainsi que celle des microfilaments constitutifs. Chaque fibre a un diamètre de 1000 à 3000 Å, les microfilaments, d'un calibre de 50 à 60 Å étant séparés à l'intérieur de la fibre par un espace de 60 à 100 Å et composés de sous-unités hélicoïdales.

Les fibres cytoplasmiques ne coexistent pas forcément, dans une même cellule, avec les microtubules et il paraît peu probable qu'elles apparaissent selon un processus artéfactique, au moment de la fixation.

Peu d'images de fibres en section transversale ont été présentées jusqu'à présent et leur identité avec les mêmes structures observées en coupe longitudinale n'a pu être affirmée avec certitude. Ces difficultés d'observation tiennent avant tout de la disposition assez irrégulière des fibres au sein de la cellule, et de leur manque de contraste en section ; en effet, seule la partie périphérique des microfilaments est dense aux électrons. L'aspect de la fibre cytoplasmique coupée transversalement que nous présentons correspond étroitement sur le plan structural à celui des mêmes fibres observées longitudinalement.

Les fibres cytoplasmiques paraissent, chez beaucoup d'espèces, être surtout abondantes dans les tissus jeunes, et en particulier dans les tissus vasculaires en cours de différenciation. C'est ainsi que, dans le cytoplasme des cellules cambiales de Pinus strobus (34), en période estivale, il existe de nombreux "filaments fins", d'un diamètre de 150 Å, qui manquent dans le matériel prélevé en hiver.

Dans les cellules de STRASBURGER de l'aiguille de Pinus pinaster, les fibres cytoplasmiques sont, au contraire, surtout nombreuses dans les cellules âgées et fortement différenciées. Ainsi, elles sont plus abondantes dans les cellules non chlorophylliennes et, parmi ces dernières, chez celles dans lesquelles le processus d'éclaircissement du cytoplasme lié au regroupement des ribosomes est poussé à son maximum. Leur présence dans le cytoplasme paraît donc correspondre à un stade de forte réorganisation cytoplasmique qui présente des analogies avec la phase de maturation de l'élément criblé.

Les fibres cytoplasmiques sont distinctes des filaments de protéine-P décrits dans les tubes criblés ou l'exsudat du phloème de nombreuses espèces (84), bien qu'elles présentent des analogies, sur le plan morphologique, avec les filaments assimilés à la protéine-$P_3$ décrits par exemple par KOLLMANN, DÖRR et KLEINIG (1970) et analysés récemment comme de l'actine -F (11). Ces filaments sont constitués d'unités élémentaires de 40 Å de diamètre et de filaments de 90 Å, formées par l'enroulement hélicoïdal des précédents. Ils présentent des analogies avec les microtubules, dont la structure a été étudiée par OLSON (205).

Bien que leur rôle soit encore assez obscur, on admet actuellement que les fibres cytoplasmiques interviendraient dans l'activité des courants protoplasmiques. Cette participation pourrait mettre en jeu des mouvements propres de la fibre, de nature ondulatoire ou hélicoïdale.

La présence de protéines-P dans les cellules albumineuses de la tige de Pinus strobus, signalée par MURMANIS et EVERT (1965), et ALFIERI et EVERT (1968), n'a pas été confirmée par ailleurs. Les cellules de STRASBURGER de l'aiguille n'en contiennent pas.

Nous évoquons par ailleurs le rôle complémentaire que pourrait jouer le tissu albumineux de l'aiguille vis à vis du phloème, dans les phénomènes de conduction. Que ce soit en période hivernale, époque à laquelle la circulation dans les tubes criblés serait réduite (208) ou nulle (10), ou en été, le tissu de transfert participe intensément à la conduction latérale des métabolites photosynthétiques. Les fibres cytoplasmiques constitueraient un élément d'appoint dans les phénomènes de diffusion intracellulaire. Toutes les cellules de STRASBURGER ne sont apparemment pas également concernées par cette activité.

## 7.4. - PLASMODESMES.

### 7.4.1. Répartition et densité des plasmodesmes

Le nombre et le développement des zones ponctuées dans les cellules de STRASBURGER justifient que l'on s'y arrête quelque peu. On constate tout d'abord que, selon les types cellulaires considérés, le regroupement des plasmodesmes s'effectue dans des zones aplaties, selon le schéma classique (207), ou bien dans des épaississements pariétaux issus d'une prolifération locale de la paroi liée à un allongement et à une digitation des tubules plasmodesmiques.

Les valeurs que nous avons mesurées en ce qui concerne la densité des pores plasmodesmiques, la longueur et le diamètre du tubule et l'importance respective des divers éléments constitutifs,se rapprochent des chiffres obtenus par divers auteurs sur d'autres matériels. Les communications plasmodesmiques apparaissent cependant particulièrement nombreuses dans le tissu de transfert.

La densité des tubules dans les zones à plasmodesmes (2 à 2,5 X $10^9$ pores/$cm^2$) est élevée ; elle est supérieure aux valeurs habituelles, par exemple,2 X $10^8/cm^2$ dans les cellules corticales de racine de Gui (164). Cette valeur est proche de celle donnée par ZIEGLER et RUCK (295) pour les cellules en trompette de Laminaire (5 à 6 X $10^9/cm^2$). PALLAS et MOLLENHAUER (207) comptent 1,5 à 2 X $10^9$ pores par $cm^2$ dans les parois terminales des cellules de garde des feuilles de certaines Dicotylédones. Dans l'endoderme des racines d'Orge, leur densité est plus faible et n'atteint que 0,67 X $10^8/cm^2$ (64).

Le diamètre du tubule mesuré au niveau du pore (4 X $10^{-6}$ cm) a une valeur comparable à celle mesurée chez d'autres espèces : 2,5 à 3 X $10^{-6}$ chez Viscum album (164), 4 à 6 X $10^{-6}$ chez Allium cepa (281) , 6 X $10^{-6}$ chez Laminaria digitata (295), 5 à 8 X $10^{-6}$ chez Dryopteris filix-mas (39), 4 à 5 X $10^{-6}$ cm dans le parenchyme de Pastèque (276), 2 à 4 X $10^{-6}$ dans le rhizocarpe de Betterave (275). Dans l'endoderme tertiaire des racines d'Orge (64) les plasmodesmes sont de calibre plus réduit : le diamètre du tubule limité par le plasmalemme, au niveau du pore, est de 1 X $10^{-6}$ cm, celui du desmotubule de 5 X $10^{-7}$ cm.

Dans les cellules parenchymateuses de la tige de Pinus strobus (199), le diamètre du pore varie selon les parois : il est ainsi de 5 X $10^{-6}$cm pour les parois transversales et tangentielles des cellules parenchymateuses radiales et de 4 à 9 X $10^{-6}$ pour les parois radiales des cellules parenchymateuses axiales et les parois horizontales des cellules des rayons. Dans le phloème de l'aiguille de Pinus silvestris (208), les pores des éléments criblés néoformés ont un diamètre de 5 à 9 X $10^{-6}$ cm, donc très comparable à celui des plasmodesmes des cellules de STRASBURGER. Cette valeur est cependant très différente de celle trouvée par MURMANIS et EVERT (1965) dans le phloème du tronc de Pinus strobus (8 X $10^{-5}$ cm), mesure effectuée, il est vrai, en microscopie optique.

Il faut rappeler à ce sujet que les plasmodesmes de divers tissus de Pinus strobus et de Sequoia ont fait l'objet d'études in vivo de LIVINGSTONE (178). Cet auteur souligne les modifications considérables apportées aux parois et aux plasmodesmes lors de la fixation et de la déshydratation surtout lorsque l'on utilise pour leur mise en évidence en fond clair divers agents gonflants ou colorants, voir par exemple LAMBERTZ (169). Des altérations du même ordre, mais d'ampleur plus réduite, peuvent intervenir lors de la préparation des tissus pour la microscopie électronique entrainant par exemple une accentuation de l'espace périplasmique et une rétraction des tubules à l'intérieur des expansions plasmodesmiques.

Ces aspects sont cependant très constants ; ils ont été décrits par GUNNING, PATE et BRIARTY (1968) dans les cellules de transfert, mais on les a retrouvés aussi dans des matériels très divers (225). On peut les considérer comme partiellement artéfactiques. La présence, dans l'espace périplasmique des expansions pariétales, d'un matériel microfibrillaire assez lâche, a également été fréquemment décrite. Elle paraît correspondre à de fréquents remaniements de la paroi à ce niveau (237, 238).

Le diamètre moyen des plasmodesmes mesuré par LIVINGSTONE (200 nm) s'écarte fortement des valeurs calculées sur coupes ultrafines. Mais l'erreur de mesure, effectuée à la limite de résolution du microscope optique, est probablement plus importante que les phénomènes de rétraction. LIVINGSTONE souligne que la cavité circulaire observée dans la lamelle moyenne des cellules de STRASBURGER est visible chez Pinus strobus sous forme de noyaux discontinus de 0,5 µ de diamètre, alors que chez Sequoia, ils sont remplacés par un corps central plus ou moins continu qui maintient apparemment une continuité des protoplasmes. Il n'y a pas toujours continuité des plasmodesmes d'un bord à l'autre de la paroi, certaines communications paraissant interrompues au niveau de la lamelle moyenne. Dans les cellules de garde des feuilles de certaines Dicotylédones, cette cavité circulaire est remplie d'une substance osmiophile (207).

7.4.2. Présence de callose au niveau des plasmodesmes

Si la callose peut être considérée comme faisant "partie intégrante et permanente" du pore criblé (82) qu'elle revêt sur les deux faces, sa présence au niveau des cellules parenchymateuses, et des cellules de STRASBURGER en particulier, n'a pu être affirmée avec certitude et ceci peut-être en raison des techniques utilisées (198). Il semble bien en fait, que toutes les zones ponctuées primaires reliant entre elles les cellules parenchymateuses de l'aiguille soient revêtues de callose. Cependant la quantité de callose présente à leur niveau est très inférieure à celle des plaques criblées. Les cellules de STRASBURGER en contiennent davantage que les autres types cellulaires parenchymateux. La synthèse de la callose se fait donc à proximité immédiate des zones ponctuées de l'aiguille assurant la diffusion des métabolites jusqu'aux éléments criblés. Elle tapisserait ainsi ces portions différenciées de paroi, avec une concentration particulière sur le pourtour du pore, comme l'ont suggéré ZIEGLER et RUCK (295).

Il est fort probable cependant que la quantité de callose mise en évidence est supérieure à celle réellement présente dans le tissu et résulte en partie d'une néoformation traumatique induite par les techniques de préparation et d'observation utilisées (83). Le matériel fixé selon la technique d'ESCHRICH et CURRIER (éthanol acétique à -70°C) en contient beaucoup moins. Il n'en est pas moins vrai que cette néoformation traduit la présence à proximité des pores plasmodesmiques de quantités importantes de précurseurs phosphorylés de la callose (uridine phosphate-glucose) contrôlés par une callose-synthétase (82). Ces précurseurs pourraient ainsi jouer un rôle dans le contrôle de la diffusion des solutés d'une cellule à l'autre.

7.4.3. Rapports des plasmodesmes avec les systèmes membranaires de la cellule

Le problème de la continuité des systèmes membranaires d'un bord à l'autre de la paroi cellulaire, dans les plasmodesmes, revêt deux aspects distincts. Une première question est de savoir si les membranes du tubule sont en continuité avec le réticulum endoplasmique et le plasmalemme cellulaire, ou bien si elles ne présentent avec lui que des rapports de contiguïté. En ce qui concerne le plasmalemme, il ne paraît pas douteux qu'il tapisse le tubule plasmodesmique ; PALLAS et MOLLENHAUER (33) soulignent que la structure trilaminaire de la membrane limitante externe au plasmodesme est identique à celle du plasmalemme. Cependant TCHOUKRII a décrit récemment (276) dans le fruit de Pastèque, des plasmodesmes non revêtus par la membrane plasmique ; il observe en outre des formations parti-

culières, les "plasmodesmosomes", mettant en relation les deux extrémités du tubule . Pour le réticulum endoplasmique, la réponse est moins nette. Dans les plasmodesmes des cellules de STRASBURGER du Pin, il apparaît clairement que la partie centrale du tubule plasmodesmique est constituée par le prolongement d'un diverticule du réticulum endoplasmique et ceci paraît la règle dans la plupart des cas (39, 64, 227). Nombre d'auteurs n'observent cependant, dans des matériels différents, aucune continuité desplasmodesmes avec le réticulum endoplasmique (207, 225, 275, 276).

On peut en outre se demander si, à l'intérieur de la paroi, plasmalemme et réticulum forment des systèmes continus ou bien au contraire interrompus, et si de plus les membranes constitutives subissent des modifications à l'intérieur du tubule.

Dans le tissu de transfert du Pin, qu'il s'agisse de plasmodesmes simples ou digités, il est particulièrement difficile de savoir si le plasmalemme et le réticulum vont d'un bord à l'autre de la paroi. Les plans de section transversale ou longitudinale des tubules apparaissent toujours limités par des membranes, mais il n'est pas possible d'affirmer que ces membranes ne sont pas interrompues. La présence d'une cavité circulaire plus ou moins continue, creusée dans la lamelle moyenne et due à la lyse partielle de celle-ci au niveau considéré (125), paraît peu compatible avec la conservation de systèmes membranaires intacts.

7.4.4. Modifications structurales des membranes plasmodesmiques

Nos observations suggèrent que la membrane limitante subit des transformations importantes en adoptant la configuration cylindrique des desmotubules. Comme l'ont montré ROBARDS (227) et BURGESS (39), la continuité du système membranaire n'exclut pas certaines modifications structurales à l'intérieur de la membrane. Dans certains cas tout au moins, la partie centrale du plasmodesme apparaît limitée non par une membrane unitaire, mais par un assemblage de sous-unités denses, l'une d'entre elles étant placée en position centrale dans la partie périphérique, rétrécie, du tubule. Ces sous-unités, qui confèrent à l'interface limitante une certaine hétérogénéité pourraient être constituées de protéines sphériques, la membrane étant localement dépourvue de lipides. Quant à la "baguette centrale" (central rod), signalée en particulier par ROBARDS, puis BURGESS, elle constituerait un artéfact, "résultant d'une coloration négative ou d'une accumulation de matériel osmiophile extrait du desmotubule pendant la préparation du tissu" (64, 227). Tous les plasmodesmes n'en contiennent pas, et il n'est pas possible, comme l'a souligné BURGESS, d'en affirmer la présence d'un bout à l'autre du tubule.

Pour MAZLIAK (communication personnelle), l'hypothèse de ROBARDS peut être adaptée aux modèles les plus récents de membranes biologiques proposés par CAPALDI et GREEN (44)etSINGER et NICHOLSON (257),modèles de membrane-hybride en mosaïque dans lesquels le feuillet bimoléculaire de lipides est traversé d'îlots protéiniques débordant de chaque côté de la membrane. Dans la partie centrale du desmotubule, les îlots protéiniques,au lieu d'être séparés par des lipides comme dans les membranes du réticulum, seraient jointifs et régulièrement arrangés. Les données du cryodécapage confirmeraient la possibilité de tels types de réarrangements.

Des modifications du même ordre, mais d'ampleur plus réduite pourraient affecter le plasmalemme limitant le tubule. On a vu que le contraste électronique de la double membrane plasmalemmique diminue lorsqu'elle s'enfonce dans la paroi pour constituer l'enveloppe limitante du tubule plasmodesmique. Il n'est pas possible d'apporter à ce phénomène une explication simple. Il faut

rejeter tout d'abord l'hypothèse d'une réduction d'accessibilité des contrastants à l'intérieur de la paroi. On pourrait penser également qu'il s'agit d'un affaiblissement du contraste lié à une simple diminution d'épaisseur. Dans une section longitudinale de tubule plasmodesmique en effet, l'épaisseur du plasmalemme ne dépasse guère 20 nm, l'épaisseur moyenne de la coupe étant de 60 nm. En fait, il n'en est rien. Si l'on examine des tubules plasmodesmiques coupés transversalement, on constate que le plasmalemme limitant est toujours beaucoup plus contrasté lorsque la section passe à proximité du plan d'abouchement du tubule à la membrane plasmique et au réticulum. Cet affaiblissement du contraste correspond selon nous à une diminution d'osmiophilie liée à une modification structurale des systèmes membranaires mis en cause. On sait en effet (270), que dans les interactions lipoprotéines /$OsO_4$,le tétroxyde d'osmium se combine surtout avec les lipides, et quand le pourcentage de protéines augmente, l'osmiophilie diminue. Les acides gras insaturés sont préférentiellement impliqués dans le processus de fixation. Ceci paraît donc correspondre à une réduction locale du taux des lipides membranaires.

Cependant les travaux de FLEISCHER ( 187 ) ont montré que la présence des lipides n'était pas indispensable pour obtenir une image tripartite en microscopie électronique, celle-ci pouvant être obtenue sur des membranes presque entièrement délipidées. Bien plus, de telles images peuvent être encore obtenues après extraction sélective de certaines protéines structurales.

Nous pensons néanmoins que la diminution du contraste du plasmalemme dans le tubule plasmodesmique est en rapport avec un appauvrissement en phospholipides membranaires, lié peut-être au réarrangement circulaire de la membrane plasmique. Ceci pourrait influer sur la perméabilité du plasmodesme, et donc sur son rôle fonctionnel.

Lorsque le desmotubule s'évase, il apparaît rempli d'un matériau beaucoup plus dense que le profil du réticulum dont il est issu. De même, le manchon hyaloplasmique entourant le tubule apparaît plus contrasté que le cytoplasme de la cellule. La nature de la substance remplissant le tubule plasmodesmique demande à être précisée. Elle est probablement très riche en lipides. Les expériences déjà anciennes de MÜHLDORF (125 ) ont montré qu'il apparaît des gouttelettes osmiophiles au niveau des plasmodesmes lorsque l'on traite les fragments de tissu par des enzymes protéolytiques. Nous avons constaté en effet qu'un traitement prolongé par la pronase provoque une lipophanérose intense au niveau des plasmodesmes, qui se remplissent d'un matériel d'aspect lipidique très dense aux électrons. On observe également ce phénomène dans les cellules âgées commençant à se nécroser. Pour PALLAS et MOLLENHAUER (207), la partie centrale osmiophile du desmotubule pourrait être une "condensation du cytoplasme fondamental " contenant peut-être une proportion élevée en lipides. Il ne peut en être ainsi, puisque le desmotubule n'est en relation qu'avec le réticulum endoplasmique. Mais la nature même de cette substance osmiophile n'en est pas pour autant précisée.

De plus nous avons retrouvé, en fond clair, sur des coupes de tissus frais colorées au noir soudan B les aspects décrits par SCOTT (48) : les canalicules plasmodesmiques contiennent des granulations lipidiques très visibles associées en chapelet d'un bord à l'autre de la paroi. Nous n'avons pas observé ces microgouttelettes sur coupes ultra-fines ; elles ont été décrites cependant par MURMANIS et EVERT (31). Bien qu'on ne puisse pas écarter l'hypothèse selon laquelle elles auraient été dissoutes au cours de la déshydratation, il paraît plus probable cependant qu'elles constituent, en fond clair, un artéfact représentant soit un démasquage partiel des lipoprotéines plasmodesmiques, soit une précipitation locale du colorant.

Il n'en reste pas moins que le desmotubule contient un matériel amorphe, relativement instable et très riche en lipides que l'on observe aussi fréquemment dans l'espace interpariétal (207). La réaction de THIERY fournit un résultat positif dont l'interprétation est délicate en raison de structures membranaires constitutives, qui réagissent également de façon positive.

### 7.4.5. Conclusion

Les cellules de STRASBURGER de l'aiguille de Pinus pinaster diffèrent des autres cellules parenchymateuses de l'aiguille non seulement-on l'a vu- par leur différenciation cytoplasmique qui les rapproche de l'élément criblé, mais aussi par leur paroi. La présence de très nombreux plasmodesmes regroupés le plus souvent dans des expansions de la paroi concourt à faire du tissu de transfert un véritable symplaste. La circulation des solutés d'une cellule à l'autre, s'effectuerait essentiellement par l'intermédiaire des réticulums endoplasmiques selon des modalités qui ont été précisées par TYREE (281) et CLARKSON, ROBARDS et SANDERSON (64). La nature, non encore précisée, de la substance osmiophile remplissant le desmotubule influerait grandement sur l'importance de ce mode de transit et sur la rapidité avec laquelle il s'effectue. La diffusion des solutés depuis leur lieu d'élaboration jusqu'aux éléments conducteurs s'effectue aussi selon un mécanisme passif par l'intermédiaire des lamelles moyennes intercellulaires. A cet égard les pectines possèdent des propriétés particulièrement favorables (échange d'ions), et elles sont très abondantes dans la paroi des cellules de STRASBURGER. Outre la circulation symplastique dont il est l'objet, le tissu de transfert jouerait donc un rôle important dans la diffusion passive des solutés photosynthétiques.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

# C O N C L U S I O N S  G E N E R A L E S

Les observations que nous avons réalisées sur les aiguilles du Pin maritime nous amènent à conclure que les cellules décrites pour la première fois par STRASBURGER (1891) entre le faisceau cribro-vasculaire et le tissu de transfusion constituent un ensemble original possédant des caractères infrastructuraux spécifiques.

## I - CARACTERES DES CELLULES DE STRASBURGER

A la différence des cellules parenchymateuses de transfusion, elles ne contiennent pas de tanin. Elles se distinguent des éléments criblés par l'absence de paroi nacrée secondaire.

Examiné plus en détail, ce tissu apparaît constitué de trois types cellulaires distincts. Les cellules périphériques ne diffèrent essentiellement des cellules de transfusion que par l'absence de polyphénols intravacuolaires. Elles sont en relation avec elles par des zones ponctuées primaires aplaties situées dans des portions amincies de la paroi. Comme elles également, elles contiennent de nombreux chloroplastes. Elles sont légèrement allongées parallèlement au grand axe de la feuille, et leurs dimensions vont en croissant vers l'intérieur du tissu. Le vacuome est très développé et ne possède pas de contenu discernable.

Les ribosomes, au sein du cytoplasme, ont une répartition homogène. Les chloroplastes ovoïdes ont un système lamellaire peu développé. Ils ont donc une activité photosynthétique réduite. A ceci peut être associée également la présence d'un réticulum tubulaire, situé à la périphérie du plaste, qui semble caractériser les plastes à faible taux de photorespiration. Dans le stroma de la plupart des chloroplastes se trouve une inclusion dense constituée de filaments enchevêtrés, et limitée par une membrane. Ce type d'inclusion n'a encore été décrit chez aucun autre type de chloroplaste. Ces structures sont sensibles à l'action de la ribonucléase et paraissent donc constituées de filaments d'acide ribonucléique. La participation, et le mode d'action, de cet ARN intraplastidal aux synthèses protéiques de la cellules restent à démontrer.

Les cellules sous-jacentes, plus nombreuses, sont dépourvues de chloroplastes. Plus allongées que les précédentes, elles ont une forme ovoïde et des dimensions irrégulières. Leur longueur s'accroît, en moyenne, vers le centre de l'aiguille. Ces cellules ont un aspect particulièrement dense, mais cette densité est variable de cellule à cellule. Elle est liée à la relative abondance des ribosomes au sein du cytoplasme, au faible développement du système vacuolaire, à la densité des systèmes membranaires intracytoplasmiques, à la présence de gouttelettes lipidiques souvent très nombreuses. Les plasmodesmes qui relient entre elles ces cellules "médianes" sont regroupés dans des portions fortement épaissies de la paroi qui peuvent constituer des expansions ou des digitations à l'intérieur du cytoplasme. Ces zones à plasmodesmes épaissies constituent un caractère morphologique très évident. Les plasmodesmes contenus dans ces expansions sont digités ; ceux des zones ponctuées des cellules chlorophylliennes sont simples. Tous possèdent la même infrastructure. Le desmotubule central est raccordé au réticulum endoplasmique cellulaire. Le plasmalemme inclus fait également suite à la membrane plasmique. Les systèmes membranaires subissent des modifications en pénétrant dans la paroi. L'apparition de sous-unités denses dans le desmotubule et l'affaiblissement du contraste du plasmalemme limitant sont probablement en rapport avec une délipidation partielle ou totale des deux systèmes membranaires,

essentiellement constitués alors de grosses molécules protéiques plus ou moins individualisées (*). Le desmotubule peut conserver un calibre constant ou bien s'évaser. Il contient alors un matériel plus dense que le cytoplasme fondamental. Divers prétraitements doux provoquent une lipophanérose intense de ce matériel, qui est donc sans doute constitué de lipoprotéines à forte teneur en lipides. Bien qu'elle soit hautement probable, il n'est pas possible d'affirmer qu'il y a continuité des systèmes membranaires d'un bord à l'autre de la paroi. Ceux-ci, sont le plus souvent intriqués dans le canal central creusé dans la lamelle moyenne.

Les plastes sphériques ont un système lamellaire très réduit mais sont entièrement garnis d'un réticulum périphérique, analogue à celui des chloroplastes, mais beaucoup plus développé. La signification et le rôle de ce réticulum tubulaire ne sont pas connus. Les phospholipides de ces systèmes membranaires internes complexes peuvent être caractérisés en microscopie optique par formation de laque chromique. Les ribosomes sont le plus souvent regroupés en amas très importants. Ce regroupement paraît préluder à une désagrégation des structures ribosomales dans le cytoplasme. Ce processus correspond à la partition des ribosomes en sous-unités qui se dispersent dans le cytoplasme sous forme de structures tubulaires de très petit diamètre, d'aspect punctiforme aux faibles grossissements du microscope électronique. Le regroupement et la désagrégation des ARN des ribosomes laissent apparaître la trame hyaloplasmique fibreuse ; cet aspect correspond à ceux observés fréquemment pendant la différenciation des tubes criblés. L'importance du regroupement en amas des ribosomes et leur degré de dilution ultérieure varient d'une cellule à l'autre. Ce processus, qui confère à chaque cellule médiane une "personnalité" propre, est achevé lorsque l'aiguille a atteint sa taille définitive ; il n'est pas évolutif. Il a pour effet de communiquer à ce type cellulaire un aspect infrastructural intermédiaire entre celui d'une cellule parenchymateuse et celui d'une élément conducteur criblé. On ne comprend pas clairement pour quelles raisons chaque cellule albumineuse médiane atteint un stade d'évolution spécifique. Un certain nombre subit une désorganisation précoce.

Dans l'évolution intracellulaire des ribosomes paraît intervenir le réticulum endoplasmique. Sous sa forme granulaire il est fréquemment associé aux plastes agranaires. Les saccules lisses sont plus abondants au centre de la cellule. Ils délimitent le plus souvent de vastes territoires autophagiques dépourvus d'organites. Le cytoplasme contient en outre des formations très denses constituées d'un aggrégat de sphérules autour d'un "noyau" central, dénommées formations morulaires. Ces structures n'apparaissent que dans les cellules où les ribosomes ont déjà subi une certaine ségrégation et leur néoformation paraît liée à la désagrégation du matériel ribosomal. Les tests cytochimiques n'ont pas permis d'identifier avec certitude les matériaux constitutifs. L'élaboration de ces formations morulaires, dont on observe des aspects intermédiaires très divers, aux dépens des ribosomes, se réaliserait au moins en partie par le biais du réticulum granulaire. Les formations morulaires sont circonscrites par des profils très serrés de réticulum lisse.

Dans les cellules médianes et, à un moindre degré, dans les cellules chlorophylliennes, on observe des fibres cytoplasmiques constituées par la juxtaposition de microfilaments individuels de même aspect que les microtubules pariétaux, mais de plus petit diamètre (48). Ces sous-unités ne sont pas incluses dans une structure membranaire. Les fibres sont disposées parallèlement au grand axe de la cellule, sans être localisées particulièrement à proximité de la paroi. Elles peuvent s'étendre sur une grande longueur.

---

(*) MAZLIAK, communication personnelle.

Les cellules situées contre les éléments criblés ont un diamètre beaucoup plus faible que les précédentes. Elles sont très allongées et régulièrement empilées comme les cellules de parenchyme vertical. La plus grande partie du volume cellulaire est occupée par une grande vacuole de part et d'autre du noyau central allongé. Dans l'aiguille adulte, le cytoplasme pariétal est désorganisé. On y discerne les traces de mitochondries et de plastes comparables à ceux des cellules médianes. Cet état nécrotique s'accompagne d'une forte surcharge lipidique.

L'aspect morphologique de ces 3 types cellulaires et leurs caractères cytologiques suggèrent que les cellules chlorophylliennes périphériques et les cellules internes ne représentent pas le type cellulaire caractéristique, pour des raisons différentes. Les cellules chlorophylliennes constituent les homologues des cellules de transfusion, mais n'élaborent pas de polyphénols. La disposition régulière des cellules internes et leur forme très allongée est due à leur origine secondaire, alors que les deux types cellulaires précédents ont une origine primaire.

## II - ORIGINE DU TISSU ALBUMINEUX

La plus grande partie du tissu albumineux dérive en effet de la différenciation progressive d'un méristème primaire intercalé entre le procambium et le méristème d'où sera issu le tissu de transfusion. Son évolution se réalise simultanément à celle du phloème. Les premières cellules albumineuses fonctionnelles sont en rapport avec le protophloème. Elles ont une paroi épaisse, un cytoplasme dense mais des organites très peu différenciés. A la dégénérescence rapide du protophloème correspond celle des cellules qui lui sont associées. A partir des cellules restées indifférenciées, à paroi mince, dérivent les cellules qui seront fonctionnelles pendant la période d'activité du métaphloème. Ces cellules sont de deux types : d'une part des cellules parenchymateuses fortement vacuolisées, d'autre part des cellules très denses, riches en ribosomes et en réticulum granulaire. Ces dernières sont en relation avec les éléments criblés par des communications mixtes, mi-plaque criblée, mi-zone ponctuée épaissie. Au cours de la phase de différenciation de ce type cellulaire intervient une période de très forte activité golgienne qui amène la production dans le cytoplasme de vésicules "en oursins". En même temps s'organisent les premières expansions plasmodesmiques. Une partie de ces cellules va disparaître pendant la période de renouvellement cambial du phloème. Elles vont s'accumuler au pôle libérien et constituer au centre du tissu albumineux l'îlot interne des cellules mortes. C'est des cellules plus périphériques restées vivantes que sont issues les cellules médianes définitives. La réalisation du type cellulaire adulte s'accompagne de modifications importantes à divers niveaux cellulaires : la paroi s'épaissit et les plasmodesmes se compliquent, les plastes perdent en grande partie leur capacité d'amylogénèse et il y apparaît un réticulum tubulaire ; les ribosomes se regroupent. Les cellules internes dérivent d'initiales cambiales extrafasciculaires dont les plus actives sont situées directement contre les éléments criblés ; certains cependant peuvent fonctionner sur la face adaxiale du tissu albumineux, contre les trachéides courtes. Les cellules produites ne présentent pas les ornementations pariétales caractéristiques des cellules médianes et ne possèdent pas de communications privilégiées avec les éléments criblés. Les cellules chlorophylliennes dérivent de la différenciation *in situ* de cellules méristématiques primaires dont le nombre est déterminé précocement.

La différenciation de la partie la plus caractéristique du tissu albumineux s'effectue donc en plusieurs étapes à partir d'un méristème primaire dont une partie reste peu différenciée jusqu'à la mise en place des cellules définitives. Chaque étape correspond étroitement aux stades d'apparition des éléments criblés. Comme pour ces derniers, les types cellulaires sont distincts pour chaque phase évolutive. La concomitance des deux processus mérite d'être soulignée.

## III - CARACTERES CYTOCHIMIQUES DES CELLULES DE STRASBURGER

Pour essayer de comprendre la signification, et le rôle joué par les cellules de STRASBURGER dans la physiologie de l'aiguille, il fallait tenter de préciser la nature de leurs divers constituants. Les observations cytochimiques effectuées sur la paroi concourrent à montrer qu'elle est nettement distincte de celle des autres cellules de l'aiguille. Elle est essentiellement constituée d'hémicelluloses et de pectines ; la cellulose ne constitue dans la partie médiane que des strates microfibrillaires peu denses. Les pectines sont très abondantes dans les espaces intercellulaires et à proximité des expansions plasmodesmiques ; elles constituent également l'essentiel de la lamelle moyenne des éléments criblés. Une fraction importante de ces composés se présente sous forme acide et non méthylée. Les groupements carboxyles libres peuvent être mis en évidence par diverses techniques ; ils sont sans doute responsables du phénomène d'autofluorescence des parois des cellules de STRASBURGER en milieu faiblement alcalin. Grâce à la fluorescence on peut aussi localiser les emplacements de la callose ; elle garnit les zones à plasmodesmes et constitue un manchon autour de chaque tubule. L'expérimentation réalisée pour caractériser les groupements aminés libres des protéines, et divers autres groupements réactifs, montre que la diversité des cellules albumineuses est en partie due à leur teneur élevée en protéines basiques ; la tyrosine et l'arginine sont particulièrement abondantes dans le noyau, le tryptophane a une localisation cytoplasmique. Les colorations obtenues varient notablement selon les cellules et constituent peut-être un critère de vitalité cellulaire.

La multiplication des tubules plasmodesmiques a, dans ce contexte, une signification précise. Outre l'augmentation des surfaces d'échanges, les modifications subies dans les parois par les membranes constitutives du tubule et la présence en son sein d'un matériel lipoprotéique interviennent peut-être dans le sens d'une activation des échanges intercellulaires.

Outre le passage osmotique actif des substances par la voie cytoplasmique, une grande partie des solutés migre vers le phloème par l'intermédiaire des lamelles moyennes. La paroi des cellules de STRASBURGER, pauvre en cellulose, à lamelle moyenne pectique développée, joue un rôle essentiel dans ce phénomène des diffusion passive par les capacités d'échange d'ions des molécules d'acide pectique.

Une fois incorporés dans les cellules de STRASBURGER, les photosynthats subissent des transformations importantes qui paraissent nécessaires avant leur translocation longitudinale dans les éléments criblés. Les deux activités enzymatiques mises en évidence sont particulièrement développées dans les cellules de STRASBURGER, et dans le phloème. La phosphomonoestérase acide est surtout localisée dans les vacuoles, le plasmalemme et la paroi cellulaire. Ces deux derniers sites renferment en outre de la glucose-6-phosphatase, qui est aussi localisée dans les plasmodesmes et dans les mitochondries. La présence d'une activité phosphatasique acide et d'une activité glucose-6-phosphatasique très développées suggèrent que dans le tissu de transfert les produits issus du chlorenchyme subissent un ensemble de phosphorylation/déphosphorylation facilitant l'accès des molécules à l'élément criblé ou les lui fournissant sous une forme plus énergétique compatible avec leur transport à longue distance (249 et 250).

## IV - ROLE DU TISSU DE TRANSFERT

Le mécanisme de différenciation du tissu de transfert pendant la croissance de l'aiguille suggère que le rôle qu'il joue dans la conduction est variable selon le degré d'évolution du phloème. Il est frappant à cet égard de constater qu'à la pointe de l'aiguille les cellules de STRASBURGER constituent les structures d'accès au phloème indispensables en l'absence d'éléments criblés différenciés et il est aisé d'établir des rapprochements très précis entre ces aspects et ceux observés dans les veinules du phloème des feuilles d'Angiospermes. Cependant,alors que dans l'aiguille jeune la totalité des cellules albumineuses sont vivantes et directement concernées par l'activité du phloème avec lequel elles sont étroitement en relation, dans l'aiguille adulte beaucoup présentent divers aspects de régression et les communications plasmodesmiques avec cet ensemble sont réduites. Les cellules qui restent vivantes présentent cependant tous les signes de cellules métaboliquement très actives. Ces observations suggèrent que les cellules de STRASBURGER jouent toujours un rôle dans la transformation des métabolites, mais que leur intervention dans la conduction longitudinale au niveau du phloème est peut-être d'une ampleur plus limitée dans l'aiguille adulte.

L'emploi des radioéléments a permis de suivre par autoradiographie la migration du carbone photosynthétique dans l'aiguille et sa translocation dans l'aiguille et le brachyblaste. Une technique de fixation et d'inclusion particulière en milieu non aqueux a été mise au point pour essayer de conserver les substances hydrosolubles. La nature des substances marquées et leur lieu d'accumulation ont été étudiés par comptage des fractions biochimiques. Le phloème est fonctionnel en toutes saisons, mais le transit s'y effectue beaucoup plus rapidement en période d'activité maximale (jours longs et températures élevées).

L'accès des solutés photosynthétiques se réalise par l'ensemble des cellules parenchymateuses ceinturant le phloème, mais leur incorporation dans les éléments criblés s'effectue essentiellement par les cellules de STRASBURGER et la partie abaxiale du phloème (phloème comprimé). On observe une concentration particulière en éléments marqués dans les cellules albumineuses ; ceux-ci sont relachés progressivement dans le phloème. La conduction longitudinale s'effectue par l'ensemble du liber dans les aiguilles adultes, par le phloème néoformé dans les aiguilles en croissance. Le tissu de transfert ne semble pas concerné directement par la conduction longitudinale. En toute saison, le carbone marqué s'incorpore essentiellement dans la fraction hydrosoluble (sucres solubles + acides aminés). La technique autoradiographique utilisée ne permet pas la conservation intégrale de cette fraction.

La présence de cellules de STRASBURGER pourvuesd'épaississements pariétaux est donc en rapport avec la présence d'un chlorenchyme périphérique. Ces cellules sont impliquées dans un mécanisme d'attraction latérale des produits issus de la photosynthèse. Les expansions plasmodesmiques ont pour effet d'augmenter considérablement la surface de contact entre cellules voisines, par la multiplication des plasmodesmes et leur pénétration dans la cavité cellulaire. Par ailleurs la pression osmotique des cellules de STRASBURGER est apparue très élevée. Nous pensons que l'ensemble du tissu de transfert constitue un "pool" à forte tonicité vers lequel sont drainés les produits hydrosolubles périphériques présents à de plus faibles concentrations.

## V - CONCLUSIONS

Les caractères cytologiques et cytochimiques des cellules albumineuses sont ceux de cellules physiologiquement très actives. Leur densité cytoplasmique correspond, on l'a vu, à une teneur élevée en histones, à la multiplicité des systèmes membranaires, à de nombreux plastes et aux gouttelettes lipidiques qu'elles renferment. Un aspect très important mérite d'être souligné : l'absence de polyphénols intravacuolaires. L'examen attentif des divers types cellulaires présents dans l'aiguille adulte montre que, outre les éléments criblés, les cellules de STRASBURGER sont les seules cellules vivantes qui ne contiennent pas de tanin. Dans l'aiguille en croissance, on constate que deux autres types cellulaires ne possèdent pas non plus de tanin dans leur phase fonctionnelle : les cellules sécrétrices des canaux (nécrosées chez l'adulte) et les cellules épidermiques dans leur phase sécrétoire, qui fait suite à une phase polyphénolique indifférenciée. Ces deux groupes cellulaires ne contiennent pas de tanin en période d'activité. Il s'agit là de cellules physiologiquement très actives et l'on peut penser que dans l'aiguille du Pin, une forte activité cellulaire est incompatible avec la synthèse de polyphénols. C'est le cas des cellules de STRASBURGER. On peut épiloguer sur la signification précise de la production par les autres cellules des leucoanthocyanes et tanins. Ces glucosides représentent sans nul doute une forme d'accumulation et de réserve des produits métabolisables. Leur teneur est beaucoup plus faible,par exemple, en période d'amylogénèse intense. Cet aspect de réserve stable ne doit pas faire oublier, à notre avis, le rôle antioxydant joué par ces substances vis-à-vis des produits intracellulaires susceptibles d'une oxydation très rapide (lipides fortement insaturés du chlorenchyme par exemple).

Les particularités infrastructurales et cytochimiques des cellules de STRASBURGER sont celles des cellules à métabolisme actif spécialisées dans l'attraction des métabolites photosynthétiques, leur transformation et leur redistribution dans le phloème. Les épaississements pariétaux qui les caractérisent constituent de véritables structures de transfert impliquées dans cette activité. Chaque cellule de STRASBURGER constitue, dans l'aiguille du Pin maritime, une cellule de transfert très comparable à celle décrite dans les veinules foliaires d'Angiospermes. L'ensemble de ces cellules étroitement en relation constitue donc un véritable tissu de transfert. La présence de ces cellules, ou de ces ensembles cellulaires, apparaît indispensable chaque fois que les lieux d'élaboration des produits du métabolisme et les sites où s'effectue leur translocation sont situés à une distance importante. C'est le cas dans les aiguilles du Pin maritime, où le tissu de transfert constitue un relais nécessaire pour la diffusion des photosynthats et plus spécialement au cours de la période de croissance. On comprend mieux alors pourquoi de telles cellules de transfert n'existent pas dans le tronc des Conifères. Les différenciations morphologiques liées à leur fonction attractive vis-à-vis des produits élaborés dans le chlorenchyme n'ont plus de raison d'être. Il est par contre très probable que d'autres cellules caulinaires assument des responsabilités dans la transformation des métabolites et la fourniture d'énergie aux tubes criblés. Ces cellules de parenchyme vertical, ou situées sur la marge des rayons, sont encore assez mal connues, bien que de nombreuses activités enzymatiques y aient été caractérisées. L'étude infrastructurale succincte que nous avons réalisée suggère que le parenchyme phloémien vertical de l'aiguille, les rayons et le parenchyme vertical de la tige présentent de fortes analogies cytologiques avec les cellules de l'aiguille. Seules ces dernières cependant constituent un véritable tissu de transfert, dont l'activité se poursuit indépendamment du degré de vitalité et des capacités de conduction des éléments criblés dont ils sont contemporains.

-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-=-

# B I B L I O G R A P H I E


1 ABBE L.B. et CRAFTS A.S., 1939, Phloem of white pine and other coniferous species. Bot. Gaz., 100, 695-722.

2 ADAMS C.W.M., ABDULLA Y.H. et BAYLISS O.B., 1967, Osmium tetroxide as an histochemical and histological reagent. Histochemie, 9, 68-77.

3 ADAMS C.W.M., ABDULLA Y.H., BAYLISS O.B. et WELLER R.O., 1965, The reaction of Baker's chromate reagent with lipids. J. Histochem. Cytochem., 13, 410-411.

4 ALBERSHEIM P., 1965, A cytoplasmic component stained by hydroxylamine and iron. Protoplasma, 60, 131-135.

5 ALBERSHEIM P. et KILLIAS U., 1963, Histochemical localization at the electron microscope level. Am. J. Bot., 50, 732-745.

6 ALBERSHEIM R., MUHLETHALER K., FREY-WISSLING A., 1960, Stained pectin as seen in the electron microscope. J. Biophys. Biochem. Cytol., 8, 501-506.

7 ANDERSON P.J., 1967, Purification and quantitation of glutaraldehyde and its effects on several enzyme activities in skeletal muscle. J. Histochem. Cytochem 15, 652-661.

8 ALBERTINI L., 1959, Etude histophotométrique de composés pectiques colorés au rouge de ruthénium. Application à l'estimation relative des composés pectiques membranaires. C. R. Acad. Sci., 248, 1019-1022.

9 ALFIERI F.J., EVERT R.F., 1968, Observations on albuminous cells in Pinus. Planta, 78, 93-97.

10 ALFIERI F.J. et EVERT R.F., 1968, Seasonal development of the secondary phloem in Pinus. Am. J. Bot., 55, 518-528.

11 ALLERA A., BECK R. et WOHLFARTH-BOTTERMANN K.E., 1971, Weitreichende fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung VIII Identifizierung der Plasmafilamente von Physarum polycephalum als F. Actin durch Anlagerung von heavy meromyosin in situ. Cytobiologie, 4, 437-449.

12 ANDERSON W.A. et ANDRE J., 1968, The extraction of some cell components with pronase and pepsin from thin sections of tissue embedded in an epon-araldite mixture. J. Micr., 7, 343-354.

13 ANDERSON A.W., PERSONNE P., ANDRE J., 1968, Chemical compartmentalization in Helix spermatozoa. J. Micr., 7, 367-390.

14 ANDERSON J.M., WOO K.C., BOARDMAN N.K., 1971, Photochemical systems in mesophyll and bundle sheath chloroplats of $C_4$ plants. Biochim. biophys. Acta, 245,398-408.

15 ARSANTO J.P., 1972, Localisation infrastructurale des activités phosphatasiques acides au cours de la différenciation des tissus conducteurs de l'hypocotyle de l'Ecballium elaterium (cucurbitacée). C.R. Ac. Sc., 274, 14, 2041-2044.

16 ASHWORTH C.T., LEONARD J.S., EIGENBRODT E.H. et WRIGHTSMAN F.J., 1966, Hepatic intracellular osmiophilic droplets. Effect of lipid solvents during tissue preparation. J. Cell. Biol., 31, 301-318.


.../...

17 BAHR G.F., 1954, Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances. Electron stains. III. Exp. Cell Research, 7, 457-479.

18 BAKER J.R., 1946, The histochemical recognition of lipine. Quart. J. micr. Sci., 87, 441-470.

19 BAKER J.R., 1956, Improvements in the Sudan black technique. Quart. J. micr. Sci, 97, 621-623.

20 BAKER J.R., 1958, Note on the use of bromophenol blue for the histochemical recognition of protein. Quart. J. micr. Sci., 99, 459-460.

21 BAKER J.R., 1958, Principles of Biological Microtechnique. John Wiley et Sons, Inc.

22 BAKER J.R., 1965, The fine structure produced in cells by fixatives. J. roy. micr. Soc., 84, 115.

23 BAKER J.R. et Mc CRAE J.M., 1966, The fine structure resulting from fixation by formaldehyde : the effects of concentration, duration and temperature. J. roy. micr. Soc., 85, 391.

24 BARRNETT R.J., ROTH W.D., 1958, Effects of fixation on protein histochemistry. J. Histochem. Cytochem., 6, 406-415.

25 BARROLLIER J. et SUCHOWSKY G., 1958, Betrachtungen über Lipoid-Farbstoffe und eine neue Methode einer Sudanfärbung. Acta histochem., 5, 294-296.

26 BEAUD G., 1961, Inclusion rapide de pièces histologiques végétales destinées à une étude autoradiographique. Bull. Micr. Appl., 11, 91-92.

27 BEHNKE O., ZELANDER T., 1970, Preservation of intercellular substances by the cationic dye Alcian blue in preparative procedures for electron microscopy. J. Ultrastruct. Res., 31, 424-438.

28 BENES K., 1968, On the stainability of plant cell walls with alcian blue. Biol. Plantarum, 10, 334-346.

29 BERG N.O., 1951, A histological study of masked lipids. Stainability, distribution and functional variations. Acta pathol. microbiol. scand., Suppl., 90, 1-192.

30 BERMES E.W. Jr., Mac DONALD H.J., 1957, Fractionation and caracterization of the lipid stain, Sudan Black B., Arch. Biochem. Biophys., 70, 49-57.

31 BISAPULTRA T., DOWNTON W.J.S., TREGUNNA E.B., 1969, The distribution and ultrastructure of chloroplasts in leaves differing in photosynthetic carbon metabolism I Wheat, Sorghum & Aristida (Gramineae). Canad. J. Bot., 47, 15-21.

32 BLANK H., Mac CARTHY P.L., 1950, A general method for preparing histologic sections with a water soluble wax. J. Lab. Clin. Med., 36, 776-781.

33 BORNMAN C.H., SPURR A.R., ADDICOTT F.T., 1969, Histochemical localization by electron microscopy of pectic substances in abscission tissues. J.S. afr. bot. 35, 253-263.

.../...

34 BOURGEOIS C. et HACK M.H., 1962, Concerning the specificity of the dichromate-hematoxylin dichromate-sudan black B techniques for the histochemical detection of phospholipids. Acta Histochem., 14, 297-306.

35 BOURGEOIS C. et HUBBARD B., 1965, A method for the simultaneous demonstration of choline-containing phospholipids and neutral lipids in tissue sections. J. Histochem. Cytochem., 13, 571-578.

36 BOWES J.A. et CATER C.W., 1966, The reaction of glutaraldehyde with proteins and other biological materials. J. R. micr. Soc., 85, 193-200.

37 BRANGEON J., KRIVITZKY M., BOURDU R., 1972, Le fractionnement des deux formes chloroplastiques des feuilles de Zea mays. Photosynthetica, 5, 384-388.

38 BRAUN H.J. et SAUTER J.J., 1964, Phosphatase - Aktivität in den Siebzellen der Koniferennadeln. Naturwissenschaften , 51, 170-171.

39 BURGESS J., 1971, Observations on structure and differentiation in plasmodesmata. Protoplasma, 73, 83-95.

40 BUVAT R., 1936, Lipides intravacuolaires dans les méristèmes de certaines racines. Rev. Cytol. Cytophysiol. vég., 2, 299-336.

41 BUVAT R. et POUX N., 1961, Observation de la trame fondamentale du "hyaloplasme" dans les cellules végétales différenciées. C. R. Ac. Sc., 252, 2915-2917.

42 CAMEFORT H., 1956, Structure de l'apex caulinaire des Gymnospermes. Année biol. 32, 401-416.

43 CAMPBELL R., 1972, Electron microscopy of the development ofneedlesof Pinus nigra var. maritima.Ann. Bot., 36, 711-720.

44 CAPALDI R.A. et GREEN D.E., 1972, Membrane proteins and membrane structure. FEBS Letters, 25, 205-209.

45 CARDE J.P., 1965, Etude histochimique de quelques composés phénoliques des pseudophylles du Pin maritime. Th. Doct. 3e Cycle.

46 CARDE J.P., 1967, Mise en évidence et répartition des phospholipides dans les aiguilles du Pin maritime. C. R. Ac. Sc., 264, 1913-1915.

47 CARDE J.P., 1968, Une nouvelle méthode d'étude pour la mise en évidence des lipides sur coupes en série ; application à la localisation des lipides dans les aiguilles du Pin maritime. C. R. Ac. Sc., 267, 597-600.

48 CARDE J.P., 1973, Le tissu de transfert (= cellules de STRASBURGER) des aiguilles du Pin maritime (Pinus pinaster Ait.)I Etude histologique et infrastructurale. J. Micr., 17, 65-88.

49 CARDE J.P., 1973, Le tissu de transfert (= cellules de STRASBURGER) des aiguilles du Pin maritime (Pinus pinaster Ait.). II Caractères cytochimiques et infrastructuraux de la paroi et des plasmodesmes. J. Micr. soumis pour publication.

50 CARLE P., CARDE J.P., Ch. BOULLAY, 1970, Comportement de piqûre de Matsucoccus, Feytaudi Duc. (coc. Margarodidae). Caractérisation histologique et histochimique des désorganisations engendrées dans le végétal (Pinus pinaster Ait. var. mesogeensis). Ann. Sci. forest., 27, 89-104.

51 CARLIER H., 1968, Etude critique au moyen de traceurs radioactifs de la conservation des lipides des chylomicrons et de la paroi intestinale de rat, en fonction de différentes techniques de préparation pour l'étude au microscope électronique. J. Micr. Fr., 7, 825-840.

52 CASLEY-SMITH J.R., 1967, Some observations on the electron microscopy of lipids. J. R. Micr. Soc., 87, 463-473.

53 CASSELMAN W.G.B., 1954, Acetylated Sudan Black B as a reagent for lipids. Biochim. Biophys. Acta, 14, 450.

54 CASSELMAN W.G., 1962, Histochimie. Dunod.

55 CATESSON A.M. et CZANINSKI Y., 1967, Mise en évidence d'une activité phosphatasique acide dans le reticulum endoplasmique des tissus conducteurs de Robinier et de Sycomore. J. Micr., 6, 509-514.

56 CATESSON A.M., 1970, Evolution des plastes de pomme au cours de la maturation du fruit. Modifications ultrastructurales et accumulation de ferritine. J. Microsc., 9, 949-974.

57 CATESSON A.M., CZANINSKI Y., 1968, Localisation ultrastructurale de la phosphatase acide et cycle saisonnier dans les tissus conducteurs de quelques arbres. Bull. Soc. fr. Phys. vég., 14, 165-173.

58 CHANG Y., 1954, Bark structure of North American conifers. U. S. Dept. Agric. Tech. Bull., 1095, 77.

59 CHAUVEAUD G., 1903, Recherches sur le mode de formation des tubes criblés dans la racine des Cryptogames vasculaires et des Gymnospermes. Ann. Sci. Nat. Bot., 18, 165-277.

60 CHAYEN J., BITENSKY L. et LONG C., 1964, The acid hematein method and the detection of masked lipids. Rés. 2e Congr. Intern. Histoch. Cytoch., Frankfurt/Main, 148-149.

61 CHAYEN J., LA COUR F. et GAHAN P.B., 1957, Uptake of benzopyrene by a chromosomal phospholipid. Nature, 180, 652-653.

62 CHEADLE V.I., GIFFORD E.M. Jr. et ESAU K., 1953, A staining combination for phloem and contiguous tissues. Stain Technol., 28, 49-53.

63 CHIFFELLE T.L., PUTT F.A., 1951, Propylene and ethylene glycol as solvents for sudan IV and sudan black B. Stain Technol., U.S.A., 26, 51-56.

64 CLARKSON D.T., ROBARDS A.W., SANDERSON J., 1971, The tertiary endodermis in barley roots : fine structure in relation to radial transport of ions and water. Planta, Allem., 96, 292-305.

65 COLLEAU C., 1968, Anatomie comparée des feuilles de Picea. Cellule, 67, 185-253.

66 COPE G.H., WILLIAMS M.A., 1968, Quantitative studies on neutral lipid preservation in electron microscopy. J. roy. micr. Soc., G.B., 88, 259-77.

67 CRONSHAW J. et ESAU K., 1967, Tubular and fibrillar components of mature and differentiating sieve elements. J. Cell Biol., 34, 801-815.

.../...

68 CUTTER E.G., 1971, Plant Anatomy.Experiment and Interpretation. Part. 2. Organs. Edward Arnold Ltd. 163-171.

69 DAM H. et GRANADOS H., 1945, Peroxidation of body-fat in vitamin E - deficiency. Acta physiol. scand., 10, 162-171.

70 DAVENPORT R. et DAVENPORT J.C., 1965, A cytochemical study of cytoplasmic basic proteins in the ascidian oocyte. J. Cell Biol., 25, 319-326.

71 DAVID R. et CARDE J.P., 1964, Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpéniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du réactif nadi. C. R. Ac. Sc., 258, 1338-1340.

72 DEANE H.W., 1958, Intracellular lipids : their detection and significance. Chap. 8 in : PALAY S.L., Ed. "Frontiers in Cytology", New Haven, Yale University Press.

73 DEIERKAUF F.A. et HESLINGA F.J.M., 1962, The action of formaldehyde on rat brain lipids. J. Histochem. Cytochem., 10, 79-82.

74 EDGREN B. et FREDRICSSON B., 1958, Estimation of the lipid dissolving capacity of polyethylene glycol. Acta Morphol. Neerlando-Scand., 1, 384-386.

75 ERICKSON R.O. et ROSEN G.U., 1949, Cytological effects of the protonoanemonin on the root tip of Zea mays. Amer. J. Botany, 36, 317-322.

76 ESAU K., 1960, Anatomy of seed plants. John Wiley & Sons.

77 ESAU K., 1969, The phloem. Handbuch der Pflanzenanatomie. Gebrüder Borntraeger.

78 ESAU K. et CHEADLE V.I., 1955, Significance of cell divisions in differentiating secondary phloem. Acta Bot. Neerl., 4, 348-357.

79 ESAU K. et CHEADLE V.I., 1965, Cytologic studies on phloem. Univ. Calif. Publ. Bot., 36, 253-344.

80 ESAU K., CHEADLE V.I. et GIFFORD E.M. Jr., 1953, Comparative structure and possible trends of specialization of the phloem. Amer. J. Bot., 40, 9-19.

81 ESCHRICH W., 1967, Bidirektionelle Translokation in Siebröhren. Planta, 73, 37-49.

82 ESCHRICH W., 1970, Biochemistry and fine structure in phloem in relation to transport. Ann. Rev. Plant. Physiol., 21, 193-214.

83 ESCHRICH W. et CURRIER H.B., 1964, Identification of callose by its diachrome and fluorochrome reactions. Stain Technol., 39, 303-307.

84 ESCHRICH W., EVERT R.F., HEYSER W., 1971, Proteins of the sieve- tube exudate of Cucurbita maxima. Planta, 100, 208-221.

85 EVERT R.F. et ALFIERI F.J., 1965, Ontogeny and structure of coniferous sieve-cells Am. J. Bot., 52, 1058-1066.

86 FEDER Ned., 1959, Polyvinil alcool as an embedding medium for lipid and enzyme histochemistry. Jour. Histochem. Cytochem., 7, 292-293.

.../...

87 FEDER N., 1963, Histochemical demonstration of lipids and enzymes in tissue specimens embedded at low temperatures in glycol methacrylate. J. Cell Biol., 19, 23 A.

88 FEDER N. et O'BRIEN T.P., 1968, Plant microtechnique : some principles and new methods. Amer. J. Bot., 55, 123-142.

89 FERRANS V.J., 1964, The fluorescence microscopy of lipids. Ph. D. Thesis. Tulasne University, U.S.A.

90 FELL K.R., ROWSON J.M., 1956, Water soluble embedding media and permanent mountants for use in histological work with botanical materials. J. r. micr. Soc., 75, 111-118.

91 FRANKE W.W., KRIEN S., BROWN R.M. Jr., 1969, Simultaneous glutaraldehyde-osmium tetroxide fixation with postosmication. An improved fixation procedure for electron microscopy in plant and animal cells. Histochemie, Dtsch, 19, 162-164.

92 FREDRICSSON B., 1958, Staining of freeze dried tissue with Sudan black B after embedding in polyethylene glycol. Acta Morphol. Neerlando-Scand., 1, 377-383.

93 FREDRICSSON B., 1958, Preservation of activities of alkaline phosphatase and naphtyl acetate splitting esterase during freeze-drying, embedding in polyethylene glycol and post-fixation. Acta Histochemica, 6, 165-173.

94 FREDRICSSON B., LAURENT T.C. et LUNIN G.B., 1958, Decomposition of Sudan black B causing an artifact in the staining of lipids. Stain Technol., 33, 155.

95 FREDRICSSON B., FUXE K., HOLMSTEDT B. et SJOQUIST F., 1960, Preservation of cholinesterase and its histochemical demonstration after freeze-drying and polyethyleneglycol embedding. Acta morphol. neerl-scand., 3, 107-114.

96 FRITZ E., ESCHRICH W., 1970, $^{14}C$-Mikroautoradiographie wasserlöslicher Substanzen im Phloem. Planta, 92, 267-281.

97 GABE M., 1968, Techniques Histologiques. Masson, Paris.

98 GAHAN P.B., 1965, Histochemical evidence for the presence of lipid on the chromosomes of animal cells. Exper. Cell Res., 39, 136-144.

99 GAHAN P.B. et Mc LEAN J., 1969, Subcellular localization and possible functions of acid B. glycerophosphatases and naphtol esterases in plant cells. Planta, 89, 126-135.

100 GANTER P. et JOLLES G., 1969, Histochimie normale et pathologique. Gauthier-Villars.

101 GAUSSEN H., 1961, Brachyblastes et pseudophylles de pins. Bull. Soc. hist. nat. Toulouse, 96, et Trav. Lab. forest. Toulouse, 1, vol VI, art. VII.

102 GEYER G., 1960, Untersuchungen zum histochemischen Glukosenachweis in der Niere. Acta histochem., 9, 329-338.

103 GIFFORD E.M. et DENGLER R.E., 1966, Histones and alkaline fast green staining of onion roots. Amer. J. Bot., 53, 1125-1132.

.../...

104 GIRAUD G., 1968, Localisation des activités phosphatasiques chez les végétaux. Bull. Soc. Fr. Phys. Vég., 14, 149-163.

105 GLAVIND J., GRANADOS H., HARTMANN S., DAM H., 1949, A histochemical method for the demonstration of fat peroxydes. Experientia, 5, 84-85.

106 GRILLOS S.J. et SMITH F.H., 1959, The secondary phloem of Douglas fir. Forest Sci., 5, 377-388.

107 GOMORI G., 1952, The histochemistry of lipid carbonyl compounds. J. Lab. clim. Med., 39, 649-659.

108 GOMORI G., 1952, Microscopic Histochemistry. Principles and Practice. Univ. of Chicago Press.

109 GRILLOS S.J. et SMITH F.H., 1959, The secondary phloem of Douglas fir. Forest Science, 5, 377-388.

110 GUILLIERMOND A. et MANGENOT G., 1923, Observations cytologiques sur le mcde de formation des essences. C. R. Ac. Sc., 177, 600-603.

111 GUNNING B.E.S., 1965, The fine structure of chloroplast stroma following aldehyde osmium fixation. J. Cell Biol., 24, 79-93.

112 GUNNING B.E.S., PATE J.S., 1969,"Transfer cells!' Plant cells with wall ingrowths specialized in relation to short distance transport of solutes - their occurence, structure and development. Protoplasma, 68, 107-133.

113 GUNNING B.E.S., PATE J.S., BRIARTY L.G., 1968, Specialized "transfer cells" in minor veins of leaves and their possible significance in phloem translocation. J. Cell Biol., 37, $C_7$-$C_{12}$.

114 GUNNING B.E.S., PATE J.S. et L.W. GREEN, 1970, Transfer cells in the vascular system of stems : taxonomy, association with nodes, and structure. Protoplasma, 71, 147-171.

115 HACK M.H. et HELMY F.M., 1967, Correlative lipid histochemistry. Acta histochem. 27, 74-84.

116 HADJIOLOFF A., 1938, Coloration des lipides au moyen de solutions hydrotropes Sudan et d'autres lipocolorants. Bull. Histol. Tech. micr., 15, 81.

117 HALBHUBER K.J. et GEYER G., 1966, Über die Verwendbarkeit von Polyäthylenglykol 600 als Einbettungsmedium in der Gefriermikrotomie mit besonderer Beruck tegung von histochemischen Ferment-und lipidnachweisen .Anat. Anz., 119, 128-13

118 HALE A.J., 1952, The effect of temperature and of relative humidity on sectioning of tissues embedded in polyethylene glycol wax. Stain Tech., 27, 189-192.

119 HALLE W., 1959, Histochemischer Nachweis von Glykogen und Lipoiden nach Einbettung in "Oxydwachs". Z. wissensch. Mikr., Dtsch., 64, 165-173.

120 HARRIS P.J., NORTHCOTE D.H., 1971, Polysaccharide formation in plant Golgi bodies. Biochim. biophys. Acta, 237, 56-64.

121 HARRIS W.M., 1971, Ultrastructural observations on the mesophyll cells of pine leaves. Canad. J. Bot., 49, 1107-1109.

.../...

122 HARRIS W.M., 1972, Ultrastructural observations on Pinaceae leaf phloem. I The spring condition. New Phytologist, 71, 169-173.

123 HASSID W.Z., 1967, Transformation of sugars in plants. Ann. Rev. Pl. Physiol., 18. 253-280.

124 HELDER R.J., BOERMA J., 1969, An electron microscopical study of the plasmodesmata in the roots of young barley seedlings. Acta bot. neerl., 18, 99-107.

125 HEPTON G.E.L. et PRESTON R.D., 1960, Electron microscopic observations of the structure of sieve-connexions in the ploem of angiosperms and gymnosperms J. Exper. Bot., 11, 381-394.

126 HESLINGA F.J.M. et DEIERKAUF F.A., 1961, The action of histological fixatives on tissue lipids. Comparison of the action of several fixativesusing paper chromatography. Jour. Histochem. Cytochem., 9, 572-577.

127 HIBBEN C.R., 1968, A simplified carbowax embedding technique for sectioning fresh leaves of woody plants. Forest Sci., 14, 298-300.

128 HILL A.W., 1901, The histology of the sieve tubes of Pinus. Ann. Bot., 15, 575-611.

129 HILL A.W., 1901, The distribution and character of "connecting threads" in the tissues of Pinus sylvetris and other allied species. Part I in : GARDINER & HILL : "The histology of the cell-wall". Phil. Trans. Roy. Soc. London Ser. B 194 , 83-125.

130 HILLIARD J.H., WEST S.H., 1971, The association of chloroplast peripheral reticulum with low photorespiration rates in a photorespiring plant species. Planta, 99, 352-356.

131 HISTOCHIMIE et CYTOCHIMIE des LIPIDES, 1966, 5e Symposium Histologicum Internationale. Sofia. Ed. Acad. Bulg. Sc.

132 HOKIN L.E. et HUEBNER D. , 1967, Radioautographic localization of the increased synthesis of phosphatidylinositol in response to pancreozymine or acetylcholine in guinea pig pancreas slices. J. Cell Biology, 33, 521-530.

133 HOLCZINGER L., 1964, The reaction of unsaturated fats with the acid hematein test. Histochemie, 4, 120-122.

134 HOLCZINGER L., 1965, Uber die unspezifische Sudanophilie. Acta Histochemica, 20, 374-380.

135 HOLCZINGER L. et BALINT Z., 1961, The staining properties of "masked" lipids. Acta histochem., 11, 284-288.

136 HOLCZINGER L. et BALINT Z., 1962, Experimental data on the theory of fat staining Histochemie, 2, 389-392.

137 HOPWOOD D., 1968, Some aspects of fixation by glutaraldehyde and formaldehyde. J. Anat., 103, 581.

138 HOPWOOD D., 1969, Fixatives and fixation : a review. Histochem. J., 1, 323-360.

139 HORI S.H., 1963, A simplified acid hematein test for phospholipids. Stain Technol., 38, 221-225.

140 HORNE VAN R.L., ZOPF L.C., 1951, Water-soluble embedding materials for botanical microtechnique. J. amer. pharm. Ass., 40, 31-34.

.../...

141 HORNER H.T. Jr et ARNOTT H.J., 1965, A histochemical and ultrastructural study of Yucca seed proteins. Americ. J. Bot., 52, 1027-1038.

142 HORNER H.T. Jr et ARNOTT H.J., 1966, A histochemical and ultrastructural study of pre-and post-germinated Yucca seeds. Bot. Gaz., 127, 48-64.

143 HORVATH A. et HORVATH J.K., 1962, The histochemistry of unsaturated lipids with reference to the adrenals. Acta Morphol. Acad. Sci. Hung, 11, 351-359.

144 HUBER B., 1947, Zur Mikrotopographie der Safströme im Transfusionsgewebe der Koniferennadel. Plante, 35, 331-351.

145 IDELMAN S., 1964, Modification de la technique de Luft en vue de la conservation des lipides en microscopie électronique. J. Micr., 3, 715-718.

146 IDELMAN S., 1965, Conservation des lipides par les techniques utilisées en microscopie électronique. Histochemie, 5, 18-23.

147 JANIGAN T.D., 1964, Tissue enzyme fixation studies. I The effects of aldehyde fixation on B. glucuronidase , B. galactosidase,N. acetyl-B. glucosaminidase and B. glucosidase in tissue blocks. Labor. Invest., 13, 1038-1050.

148 JANIGAN D.T., 1965, The effects of aldehyde fixation on acid phosphatase activity in tissue blocs. J. Histochem. Cytochem., 13, 476-483.

149 JENSEN W.A., 1960, The composition of the developing primary wall in onion root tip cells. II Cytochemical localization. Amer. J. Bot., 47, 287-295.

150 JENSEN W.A., 1962, Botanical Histochemistry. Freeman & C°.

151 JEWELL G.G., SAXTON C.A., 1970, The ultrastructural demonstration of compounds containing 1,2. glycol in plant cell walls. Histochem. J. 2, 17-27.

152 JONES D. et AUSTIN G., 1966, Reaction of formaldehyde with unsaturated fatty acids during histological fixation. Nature, 210, 1386-1388.

153 JONES R.M. et GOODALE F., 1962, Improvements in the method of embedding tissue in carbowax. Am. J. Clin. Pathol., 38, 173-175.

154 JONES D., 1969, The reaction of formaldehyde with unsaturated fatty acids during histological fixation. Histochem. J., 1, 459-491.

155 JUNIPER B.E., COX G.C., GILCHRIST A.J., WILLIAMS P.R., 1970, Techniques for Plant Electron Microscopy. Blackwell Scientific Publications, 49-50.

156 KANWAR K.C., 1961, Chrome-osmium fixatives and the neutral lipids. The Microscope, 13, 29-32.

157 KARNOVSKY M.L. et DEANE H.W., 1955, Aldehyde formation in the lipid droplets of the adrenal cortex during fixation, as demonstrated chemically and histochemically. J. Histochem. Cytochem., 3, 85-102.

158 KENNECKE M., ZIEGLER H., RONGINE DE FEKETE M.A., 1971, Enzymaktivitäten im Siebröhrensaft von Robinia pseudoacacia L. und anderer Baumarten. Planta, 98, 330-356.

159 KHAN K.A., RIEMERSIND J.C., BOOIJ H.L., 1961, The reactions of osmium tetroxide with lipids and other compounds. J. Histochem. Cytochem., 9, 560-563.

.../...

160 KIDWAI P., ROBARDS A.W., 1969, The appearance of differentiating vascular cells after fixation in different solutions. J. exper. Bot., 20, 664-670.

161 KOLLMANN R., DÖRR I., KLEINIG H., 1970, Protein filaments. Structural components of the phloem exsudate. I Observations with Cucurbita and Nicotiana. Planta, 95, 86-95.

162 KORN E.D., 1967, A chromatographic and spectrophotometric study of the reaction of osmium tetroxide with unsaturated lipids. J. Cell Biol., 34, 627-638.

163 KOSHUCHOWA S., GÖRING H., 1968, Über die Lokalisation löslicher Zucker in Keimlingswurzeln. Protoplasma, 65, 327-333.

164 KRULL R., 1960, Untersuchungen über den Bau und die Entwicklung der Plamodesmen in Rindenparenchym von Viscum Album. Planta, 55, 598-629.

165 KUSANAGI A. et TANAGI T., 1970, Cytochemical determination of changes in nuclear histone content ir differentiating root cells of barley and garlic. Protoplasma, 69, 279-282.

166 KUTT H., LOCKWOOD D. et Mc DOWELL F., 1959, Decomposition of Sudan black B by ultraviolet light and gases ; its lipid and protein staining properties. Stain Technol., 34. 203-208.

167 LAETSCH W.M., 1968, Chloroplast specialization in dicotyledons possessing the $C_4$-dicarboxylic acid pathway of photosynthetic $CO_2$ fixation. Amer. J. Bot., 55, 875-883.

168 LAETSCH W.M. et PRICE I., 1969, Development of the dimorphic chloroplasts of sugar cane. Amer. J. Bot., 56, 77-87.

169 LAMBERTZ P., 1954, Untersuchungen über das Vorkommen von Plasmodesmen in den Epidermaussenwänden. Planta, 44, 147-190.

170 LAMPORT D.T.A., 1970, Cell wall metabolism. Ann . Rev. Plant Physiol., 21, 235-270.

171 LEA C.H., 1956, Antioxidation. Nature, 178, 776.

172 LEA C.H., SWOBODA P.A.T., 1957, The antioxidant action of some polyphenolic constituents of tea. Chem. and Industry, 1073-1074.

173 LEDERER B., 1955, Vergleichende Untersuchungen über das Transfusionsgewebe einiger rezenter Gymnospermen. Bot. Studien, 4, 1-42.

174 LEE D.R., 1972, Possible significance of filaments in sieve elements. Nature, 235, 286.

175 LILLIE R.D. et BURTNER H.J., 1952, On fat peroxides in human polymorphonuclear peroxides. J. nat. Cancer Inst., 13, 220.

176 LISON L., 1934, Sur les nouveaux colorants histologiques spécifiques des lipides. C. R. Soc. Biol., 115, 202-205.

177 LISON L., 1960, Histochimie et Cytochimie Animales. 3e ed. Gauthier-Villars.

178 LIVINGSTON L.G., 1964, The nature of plasmodesmata in normal (living) plant tissue. Amer. J. Bot., 51, 950-957.

.../...

179 LOJDA Z.,1965, Fixation in histochemistry. Folia Morphol., 13, 65-83.

180 LUDWIG F., 1953, Les hydrocarbures liposolubles polycycliques en tant que fluorochromes des graisses tissulaires. Bull. Micr. appl., 3, 22-27.

181 LUFT J.H., 1964, Electron microscopy of cell extraneous coats as revealed by ruthenium red staining. J. Cell Biol., 23, 54 a.

182 MAÁCZ G.J., VÁGÁS E., 1961, A new method for staining of cellulose and lignified cell walls. Mikroskopie, 16, 40-43.

183 MACROBBIE E.A.C., 1971, Phloem translocation. Facts and mechanisms : a comparative survey.Biol. Rev., 46, 429-481.

184 MARTINOLI G., 1957, L'impiego dei glicoli polietilenici e poliglocoli solidi (carbowax) nella tecnica dell' inclusione per preparati istologici. Ann. Bot., 25, 498-501

185 MARTY F., 1972, Distribution des activités phosphatasiques acides au cours du processus d'autophagie cellulaire dans les cellules du méristème radiculaire d'Euphorbia characias L. C. R. Ac. Sc., 274, 206-209.

186 MAZLIAK P., 1968, Le Métabolisme des Lipides dans les Plantes Supérieures. Masson, Paris.

187 MAZLIAK P., 1971, Les membranes protoplasmiques. Doin, Paris.

188 MENZIES D.W., 1962, Paraffin-Beeswax-Stearic Acid : an embedding mass for thin sections. Stain Technol., 37, 235-238.

189 MERRIAM R.W., 1958, Standard chemical fixations as a basis for quantitative investigations of substances other than DNA. J. Histochem. Cytochem., 6, 43-51.

190 MILES A.E.W., LINDER J.E., 1952, Polyethylene glycols as histological embedding media : with a note on the dimensional change of tissue during embedding in various media. J. r. micr. Soc., 72, 199-213.

191 MONNERON A., 1966, Utilisation de la pronase en cytochimie ultrastructurale. J. Microscopie, 5, 583-596.

192 MONNERON A. et BERNHARD W., 1966, Action de certaines enzymes sur les tissus inclus en épon. J. Microsc., 5, 697-714.

193 MORGAN T.E. et HUBER G.L., 1967, Loss of lipid during fixation for electron microscopy. J. Cell Biol., 32, 757-760.

194 MUELLER D.M.J., 1972, Observations on the ultrastructure of Buxbaumia protonema. Plasmodesmata in the cross walls. Bryologist, 75, 63-68.

195 MÜLLER G., 1955, Über den histotopochemischen Nachweis von Glukose in der Leber und Niere der weissen Maus. Acta histochem., 2, 73-80.

196 MURMANIS L., 1971, Particles and microtubules in vascular cells of Pinus strobus L. during cell wall formation. New Phytol, 70, 1089-1093.

197 MURMANIS L. et EVERT R.F., 1965, Ultrastructure of the secondary phloem of Pinus strobus. Am. J. Bot., 52, 627-628.

198 MURMANIS L. et EVERT R.F., 1966, Some aspects of sieve cell ultrastructure in Pinus strobus. Am. J. Bot., 53, 1065-1078.

.../...

199 MURMANIS L. et EVERT R.F., 1967, Parenchyma cells of secondary phloem in Pinus strobus. Planta, 73, 301-318.

200 NAGATA T., NAWA T., YOKOTA S., 1969, A new technique for electron microscopic dry-mountiny radioautography of soluble compounds. Histochemie, 18, 241-249.

201 NEWCOMB E.H., 1969, Plant microtubules. Ann. Rev. Pl. Physiol., 20, 253-288.

202 O'BRIEN T.P., FEDER N. et Mc CULLY M.E., 1964, Polychromatic staining of plant cell walls with toluidine blue O. Protoplasma, 59, 368-373.

203 O'BRIEN T.P., THIMANN K.V., Intracellular fibers in oat coleoptile cells and their possible significance in cytoplasmic streaming. Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 888-894.

204 OLSON A.C., BONNER J. et MORRÉ D.J., 1965, Force extension analysis of Avena coleoptiles cell walls. Planta, 66, 126-134.

205 OLSON L.W., HEATH I.B., 1971, Observations on the ultrastructure of microtubules. Zellforsch. mikr. Anat., 115, 388-395.

206 OUTER R.W. DEN., 1967, Histological investigations on the secondary phloem of gymnosperms. Wageningen Lambouwhogesch. Mededel.,67, 118 p.

207 PALLAS J.E. jr., MOLLENHAUER H.H., 1972, Electron microscopic evidence for plasmodesmata in dicotyledonous guard cells., Science, 175, 1275-1276.

208 PARAMESWARAN N., 1971, Zur Feinstruktur der Assimilatleitbahnen in der Nadel von Pinus silvestris. Cytobiologie, 3, 70-88.

209 PARAMESWARAN N., LIESE W., 1970, Zur Cytologie der Strasburger-Zellen in Coniferennadeln. Naturwissenschaften, 57, 45-46.

210 PARTHASARATHY M.V. et MÜHLETHALER K., 1972, Cytoplasmic microfilaments in plant cells. J. Ultrastr. Res., 38, 46-62.

211 PATE J.S. et GUNNING B.E.S., 1969, Vascular transfer cells in Angiosperm leaves - a taxonomic and morphological survey. Protoplasma, 68, 135-156.

212 PATE J.S., GUNNING B.E.S., MILLIKEN F.F., 1970, Function of transfer cells in the nodal regions of stems, particularly in relation to the nutrition of young seedlings. Protoplasma, 71, 313-334.

213 PEARSE A.G.E., 1968, Histochemistry. Theoretical and Applied. Churchill. London.

214 PERKINS N.J., NELSON C.D. et GORHAM P.R., 1959, A tissue-autoradiographic study of the translocation of $C^{14}$-labelled sugars in the stems of young soybean plants. Can. J. Bot., 37, 871-877.

215 PETERSON C.A., CURRIER H.B., 1969, An investigation of bidirectional translocation in the phloem. Physiol. Plantarum, 22, 1238-1250.

216 PFEIFFER H.H., 1963, Cytotopochemische Beiträge zum Lipidvorkommen in Vakuolen. (Contribution cytotopochimique à la mise en évidence des lipides dans les vacuoles.) Protoplasma, 57, 636-642.

217 PILET P.E., 1971, Les Parois cellulaires. Doin, Paris.

.../...

218 POUX N., 1970, Localisation d'activités enzymatiques dans le meristème radiculaire de Cucumis sativus L. III Activité phosphatasique acide. J. Micr. 9, 407-434.

219 PRETOPARVIS V., TUROLLA E., 1953, Presentazione di preparati per la messa in evidenza dei lipidi dopo inclusione in glicoli polietilenici. Mon. Zool. It., 61, 324-326.

220 PUCHTLER H., SWEAT F. et LEVINE M., 1962, On the binding of Congo red by amyloid. J. Histochem. Cytochem., 10, 355-364.

221 REEVE R.M., 1959, A specific hydroxylamine-ferric chloride reaction for histochemical localization of pectin. Stain Technol., 34, 209-211.

222 RICHTER H., 1967, Mechanism der Zellwandfärbung mit basischen Farbstoffen. Mit einem Beitrag zur Bestimmung von Pektinkonzentration in situ.

223 RINEHART J.F., ABUL-HAJ S.K., 1951, Histological demonstration of lipids in tissue after dehydration and embedding in a polyethylene glycol. Arch. Pathol., 51, 666-669.

224 RIOPEL J.L. et SPURR A.R., 1962, Carbowax for embedding and serial sectioning of botanical material. Stain Technol., 37, 357-362.

225 ROBARDS A.W., 1968, A new interpretation of the plasmodesmatal structure. Planta, 82, 200-210.

226 ROBARDS A.W., 1968, Desmotubule:a plasmodesmatal structure. Nature. 218, 784.

227 ROBARDS A.W., 1971, The ultrastructure of plasmodesmata. Protoplasma, 72, 315-323.

228 ROBARDS A.W. et HUMPHERSON P.G., 1967, Phytoferritin in plastids of the cambial zone of willow. Planta, 76, 169-178.

229 ROBARDS A.W. et ROBINSON C.L., 1968, Further studies on phytoferritin. Planta, 82, 179-188.

230 ROBERTSON C.M., 1963, An attempt to use polyethylene glycols as routine histological embedding media. Canad. J. Med. Technol., 25, 198-203.

231 ROBERTSON E.A., SCHULTZ R.L., 1970, The impurities in commercial glutaraldehyde and their effect on the fixation of brain. J. Ultrastr. Res., 30, 275-287.

232 ROGERS A.W., 1967, Techniques of autoradiography. Elsevier, Amsterdam.

233 ROGERS H.J. & PERKINS H.R., 1968, Cell Walls and Membranes. London . Spon.

234 ROLAND J.C., 1968, Recherches sur l'infrastructure de l'espace membranaire des cellules végétales. C. R. Ac. Sc., 267, 712-715.

235 ROLAND J.C., 1969, Localisation d'activités enzymatiques au niveau des ultrastructures des collocytes en croissance de Ballota nigra. C. R. Ac. Sc., 268, 2052-2055.

236 ROLAND J.C., 1970, Extractions enzymatiques ou chimiques de polysaccharides cellulaires végétaux. Application à l'étude des parois. In : "Micr. électron. 7e Congr. intern. Grenoble, Rés. III". Paris, Soc. fr. Micr. électron., 115-116.

237 ROLAND J.C., SANDOZ D., 1969, Détection cytochimique des sites de formation des polysaccharides pré-membranaires dans les cellules végétales. J. Micr., 8, 263-268.

238 ROLAND J.C., VIAN B., 1970, Précisions sur la localisation et les caractères ultrastructuraux de polysaccharides acides dans les cellules végétales. C. R. Ac. Sc., 271, 572-575.

239 ROLAND J.C., VIAN B., 1971, Réactivité du plasmalemme végétal. Etude cytochimique. Protoplasma, 73, 121-137.

240 ROTHMAN A.H., 1969, Alcian blue as an electron stain. Exper. Cell Res., 58, 177-179.

241 ROTHSTEIN R., 1966, The use of carbowax sections in the histochemical identification of lipids and other intracellular chemicals in amphibian and mammalian tissues. Turtox News, 44, 34-37.

242 ROUGIER M., 1971, Etude cytochimique de la sécrétion des polysaccharides végétaux à l'aide d'un matériel de choix : les cellules de la coiffe de Zea mays. J. Micr. Fr., 10, 67-82.

243 ROUGIER M., VIAN B., GALLANT D., ROLAND J.C., 1973, Aspects cytochimiques de l'étude ultrastructurale des polysaccharides végétaux. Année Biol., 12, 43-75.

244 RUMBAUGH R. G., 1964, A routine paraffin technique and stain for the demonstration of lipid deposits in tissue sections. Amer. J. Med. Technol., 30, 313-320.

245 SABATINI D.D., BENSCH K. et BARRNETT R.J., 1963, Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. J. Cell Biol., 17, 19-58.

246 SABATINI D.D., MILLER F., et BARRNETT R.J., 1963, Aldehyde fixation for morphological and enzyme cytochemical studies with the electron microscope. J. Histochem. Cytochem., 12, 57-71.

247 SANDSTROM B., WESTMAN J., 1969, Non freezing light and electron microspic enzyme histochemistry by means of polyethylene glycol embedding. Histochemie, 19, 181-183.

248 SAUTER J.J., 1967, Untersuchungen zur cytochemischen Oxydase lokalisation in Sphärosomen verschiedener Gewebe von Populus. Z. Pflanzenphysiol., 57, 352-367.

249 SAUTER J.J. et BRAUN H.J., 1968, Histologische und cytochemische Untersuchungen zur Funktion der Baststrahlen von Larix decidua Mill. unter besonderer Berücksichtigung der Strasburger-Zellen. Z. Pflanzenphysiol. 59, 420-438.

250 SAUTER J.J. et BRAUN H.J., 1972, Cytochemische Untersuchung der Atmungsaktivität in den Strasburger-Zellen von Larix und ihre Bedeutung für den Assimilättransport. Z. Pflanzenphysiol., 66, 440-458.

251 SCHOTT H.J. et SCHONER W., 1964, Zur Frage der Abhängigkeit der Fettfärbung mit Sudanschwarz B vom pH des Lösungsmittels. Frankfurt. Z. Path., 73, 328-339.

252 SCHOTT H.J. et SCHONER W., 1965, Beitrag zur Fettspezifitat des Sudanschwarz B und anderer roter sudanfarbstoffe bein Reinsubstanzen. Histochemie, 5, 154-162.

253 SCHUMACHER W., 1967, Die Fernleitung der Stoffe in Pflanzenkörper. Handb. Pflanzenphysiol., 13, 61-177.

254 SCOTT F.M., 1955, The distribution and physical appearance of fats in living cells. Amer. J. Bot., 42, 475-480.

255 SERRA J.A., 1958, Cytochemical demonstration of masked lipids. Science, 128, 28-29.

256 SHEA S.M., 1971, Lanthanum staining of the surface coat of cells. Its enhancement by the use of fixatives containing Alcian blue or cetylpyridinium chloride. J. Cell Biol., 51, 611-620.

257 SINGER S.J. et NICHOLSON G.L., 1972, The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science, 175, 720-731.

258 SLACK C.R., HATCH M.D., GOODCHILD D.J., 1969, Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the $C_4$-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem. J., 114, 489-498.

259 SMITH F.H., 1958, Anatomical development of the hypocotyl of Douglas-Fir. For. Sci., 4, 61-70.

260 SPANNER D.C., JONES R.L., 1970, The sieve tube wall and its relation to translocation. Planta, 92, 64-72.

261 SPURR A.R., 1969, A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultrastr. Res., 26, 31-43.

262 SRIRAMACHARI S. et RAMALINGASWAMI V., 1952, Polyethylene glycols as embedding media in histochemical work. J. Clin. Path., 5, 345-349.

263 SRIVASTAVA L.M., 1963, Secondary phloem in the Pinaceae.Univ. Calif. Publ. Bot., 36, 1-142.

264 SRIVASTAVA L.M., 1969, On the ultrastructure of cambium and its vascular derivatives III The secondary walls of the sieve elements of Pinus strobus. Amer. J. Bot., 56, 354-361.

265 SRIVASTAVA L.M . et O'BRIEN T.P., 1966, On the ultrastructure of cambium and its vascular derivatives. I Cambium of Pinus strobus L.Protoplasma, 61, 257-276.

266 SRIVASTAVA L.M. et O'BRIEN T.P., 1966, On the ultrastructure of cambium and its vascular derivatives. II Secondary phloem of Pinus strobus L. Protoplasma, 61, 277-293.

267 STERLING C., 1970, Crystal structure of ruthenium red and stereochemistry of its pectic stain. Amer. J. Bot., 57, 172-175.

268 STILLER D., 1965, Histochemische Untersuchungen zum Nachweis von Monosacchariden I Untersuchungen zur Fixierung und zum Nachweis verschiedener Zucker mittels Filter papierstreifen durch die Reaktion von Okamoto, Kadota und Ayoama. Acta Histochem., 21, 299-312.

269 STILLER D., 1965, Histochemische Untersuchungen zum Nachweis von Monosacchariden. 2 Untersuchungen zur Fixierung und zum Nachweis versch dener Zuckerphosphate mittels Filterpapierstreifen durch die REaktion von Okamoto, Kadota und Ayoama. Acta Histochem., 22, 46.

270 STOECKENIUS W., 1960, Osmium tetroxide fixation of lipids. Ned. Vereinig voor Elektronmikroskopie, 2, 716-720.

271 STRASBURGER E., 1891, Ueber den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Histologische Beiträge. Heft III. Jena, Gustaf Fischer, 98-133.

271 STRUGGER S., 1938, Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6G. Protoplasma, 30, 85-100.

272 TCHACAROF E. et POSALAKY Z., 1963, Critical studies on the use of polyethylene glycols in lipid histochemistry. Acta histochem., 15, 27-36.

273 TCHACAROF E. et POZALAKY Z., 1964, Sur le processus de fixation des lipides dans les coupes de matériel non fixé, confectionnées au cryostat. Compt. Rend. Acad. Bulgare Sci., 17, 197-200.

274 TCHACAROF E. et POZALAKY Z., 1964, On the fixation of lipids in sections of unfixed materials. Folia Histochem. Cytochem., 2, 123-129.

275 TCHOUKRII M.G., 1971, En russe. Quelques données sur l'infrastructure des plasmodesmes. Izvest. Akad. nauk Moldav S.S.S.R., biol. khim. nauk, 3, 10-13.

276 TCHOUKRII M.G., 1971, En russe. Organisation inframicroscopique du parenchyme du fruit de pastèque. Izvest. Akad. nauk Moldav S.S.S.R., biol. khim. nauk, 4, 3-7.

277 TERNER J.Y., SCHNUR J. et GURLAND J., 1963, Stable sudanophilia. Contributions to the histochemistry of Sudan dyes. Lab. Invest., 12, 405-414.

278 THIERY J.P., 1967, Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6, 987-1018.

279 TICE L.W. et BARRNETT R.J., 1965, Diazophtalocyanins as reagents for fine structural cytochemistry. J. Cell Biol., 25, 23-41.

280 TRIPODI G., 1970, Localization of tryptophan rich proteins and beta-glycerophosphatase activity in Cuscuta haustional cells. Protoplasma, 71, 191-196.

281 TYREE M.T., 1970, The symplast concept. A general theory of symplastic transport according to the thermodynamics of irreversible processes. J. Theor. Biol., 26, 181-214.

282 VOLK B.W. et POPPER H., 1944, Microscopic demonstration of fat in urine and stool by means of fluorescence microscopy. Amer. J. clin. Path., 14, 234-238.

283 WALKER W.S., 1959, A modification of the carbowax embedding technique for plant tissues. Proc. Iowa Acad. Sci., 66, 81-85.

284 WARK, 1965, Fine structure of the phloem of Pisum sativum. II The companion cell and phloem parenchyma. Austral. J. Bot., 13, 185-193.

285 WIGGLESWORTH V.B., 1957, The use of osmium in the fixation and staining of tissues. Proc. r. Soc., Ser. B., 147, 185-199.

286 WILCOX H., 1962, Growth studies of the root of incense cedar Libocedrus decurrens. I The origin and development of primary tissues. Amer. J. Bot., 49, 221-236.

287 WILCOX H.E. et MARSH L.C., 1964, Staining plant tissues with chlorazol black E and Pianese III-b. Stain Technol. 39, 81-86.

288 WOLMAN M.D., 1961, The use of chemical agents in the histochemical demonstration of lipids. Acta Histochem., Suppl. II, 140-154.

.../...

289 WOODING F.B.P., 1966, The development of the sieve-elements of Pinus pinea. Planta, 69, 230-243.

290 WOODING F.B.P., 1968, Radioautographic and chemical studies of incorporation into sycamore vascular tissue walls. J. Cell Sci., 3, 71-80.

291 WOODING F.B.P., et NORTHCOTE D.H., 1965, Association of the endoplasmic reticulum and the plastids in Acer and Pinus. Amer. J. Bot., 52, 526-531.

292 YANAGI T. KUSANAGI A., 1970, Cytochemical and biochemical determinations of changes in nuclear histone content during differenciation of barley root cells. Devel. Growth Differ. Jap., 12, 1-12.

293 ZIEGLER H., 1965, Die Physiologie pflanzlicher Drüsen. Ber. Deut. Bot. Ges., 78, 466-477.

294 ZIEGLER H. et HUBER F., 1960, Phosphataseaktivität in den "Strasburger-Zellen" der Koniferennadeln. Naturwiss., 47, 305.

295 ZIEGLER H. et I. RUCK, 1967, Untersuchungen über die Feinstruktur des Phloems III Die "Trompetenzellen" von Laminaria Arten. Planta, 73, 62-73.

296 ZIRKLE C., 1928, The effect of hydrogen ion concentration upon the fixation image of various salts of chromium. Protoplasma, 4, 201-227.

297 ZIRKLE C., 1929, Fixation images with acetates and chromates. Protoplasma, 5, 511-534.

298 ZIRKLE C., 1932, Vacuoles in primary meristems. Zeits. Zellforsch. Mikr. Anat., 16, 26-45.

299 ZIRKLE C., 1933, Aldehydes as cytological fixatives. Protoplasma, 20, 170-180.

300 ZUGIBE F.T., KOPACZYK K.C., CAPE W.E. et LAST J.H., 1958, A new carbowax method for routinely performing lipid, hematoxylin and eosin, and elastic staining on adjacent freeze-dried or formalin-fixed sections. J. Histochem. Cytochem., 6, 133-138.

301 ZWEIBAUM J. et MANGENOT G., 1923, Application à l'étude histochimique des végétaux d'une méthode permettant la coloration vitale et post-vitale des graisses dans la cellule animale. C. R. Soc. Biol., 89, 540.

# T A B L E  D E S  M A T I E R E S


INTRODUCTION

CHAPITRE I - Matériel et méthodes

1.1. Modalités de prélèvements ... 7
1.2. Techniques histologiques ... 7
1.3. Techniques cytologiques ... 10
1.3.1. Microscopie optique ... 10
1.3.2. Microscopie électronique ... 11
1.4. Méthodes d'étude de la paroi cellulaire ... 12
1.4.1. Observations en microscopie optique ... 12
1.4.2. Observations en microscopie électronique ... 13
1.5. Techniques d'étude des lipides ... 14
1.5.1. Mise en évidence des lipides neutres ... 14
1.5.2. Mise en évidence des phospholipides ... 18
1.6. Techniques d'étude des protéines cellulaires ... 18
1.7. Mise en évidence de deux activités enzymatiques ... 21
1.7.1. Activité glucose-6-phosphatasique ... 21
1.7.2. Activité phosphatasique acide ... 21
1.8. Extractions par la pronase et la ribonucléase ... 22
1.8.1. Action de la pronase ... 22
1.8.2. Action de la ribonucléase ... 22
1.9. Techniques autoradiographiques ... 22
1.9.1. Techniques d'incorporation ... 24
1.9.2. Modalités de prélèvement et de fixation ... 25
1.9.3. Préparation des lames pour l'autoradiographie ... 26
1.9.4. Développement, coloration, montage ... 27
1.9.5. Examen des préparations ... 27

CHAPITRE II - Etude histologique des cellules de STRASBURGER foliaires

Choix des critères ... 29
2.1. Distribution des cellules albumineuses dans les divers organes foliaires ... 31
2.1.1. Cotylédon ... 31
2.1.2. Euphylle ... 32
2.1.3. Pseudophylle ... 32
2.2. Etude histologique des cellules albumineuses de l'aiguille ... 34
2.2.1. Les cellules chlorophylliennes ... 34
2.2.2. Les cellules "médianes" ... 35
2.2.3. Les cellules "internes" ... 35
2.3. Evolution de la structure du tissu albumineux selon le niveau de l'aiguille ... 36
2.3.1. A l'extrême pointe de l'aiguille ... 36
2.3.2. Région terminale ... 36
2.3.3. A la base de l'aiguille ... 37
2.3.4. Dans le brachyblaste et le rameau long ... 37
2.3.5. Conclusions ... 38

CHAPITRE III - Etude infrastructurale des cellules de STRASBURGER de l'aiguille adulte


3.1. Cellules chlorophylliennes ... 39
3.2. Cellules médianes ... 42
3.3. Cellules internes ... 44
3.4. Zones à plasmodesmes ... 45
3.5. Cellules de STRASBURGER de la base de l'aiguille ... 47
3.6. Cellules du parenchyme vertical du phloème ... 47
3.7. Cellules de STRASBURGER du rameau court ... 48


CHAPITRE IV - Etude cytochimique des cellules de STRASBURGER adultes


4.1. Etude de la paroi ... 49
4.1.1. Microscopie photonique ... 49
4.1.2. Microscopie électronique ... 50
4.1.3. Conclusions ... 53
4.2. Etude des lipides ... 54
4.2.1. Localisation intracellulaire des lipides neutres dans les cellules de STRASBURGER ... 54
4.2.2. Localisation intracellulaire des phospholipides ... 55
4.2.3. Discussion ... 55
4.3. Mise en évidence cytochimique des protéines cellulaires ... 62
4.4. Données fournies par les digestions enzymatiques à la ribonucléase et à la pronase ... 64
4.4.1. Action de la ribonucléase ... 64
4.4.2. Action de la pronase ... 64
4.4.3. Conclusions ... 64
4.5. Mise en évidence d'activités enzymatiques dans les cellules de STRASBURGER ... 65
4.5.1. Phosphatase acide ... 65
4.5.2. Glucose-6-phosphatase ... 66
4.5.3. Conclusions ... 67


CHAPITRE V - Etude ontogénique du tissu de transfert


5.1. Evolution histologique ... 69
5.1.1. Introduction ... 69
5.1.2. Les premiers stades du développement ... 69
5.1.3. Evolution des cellules albumineuses : étude de coupes sériées d'une aiguille en voie de développement. Origine et devenir des différents types cellulaires ... 71
5.1.4. Les stades ultérieurs du développement ... 76
5.1.5. Conclusions ... 78
5.2. Etude ontogénique infrastructurale ... 79
5.2.1. Le méristème fondamental. Mise en place de la paroi ... 79
5.2.2. Différenciation des cellules albumineuses I contemporaines du protophloème ... 80
5.2.3. Différenciation des cellules albumineuses II contemporaines du métaphloème ... 81
5.2.4. Maturation des cellules albumineuses III et formation des cellules définitives ... 83

5.2.5. Incorporation au tissu de transfert de cellules secondaires ... 84
5 2.6. Cas particulier des cellules chlorophylliennes ... 85

CHAPITRE VI - Etude autoradiographique de l'incorporation du $^{14}CO_2$ dans les aiguilles de Pinus pinaster

6.1. Incorporation instantanée ... 87
6.2. Fractions biochimiques marquées ... 87
6.3. Influence des modalités de fixation ... 88
6.4. Localisation intracellulaire dans les aiguilles des produits marqués ... 88
6.5. Accès du marquage au tissu de transfert et au phloème ... 90
6.6. Migration longitudinale ... 92
6.7. Devenir des produits marqués dans l'aiguille et le rameau court ... 92
6.8. Migration des métabolites dans la tige ... 93
6.9. Evolution ultérieure dans l'aiguille ... 93
6.10. Conclusions ... 93

CHAPITRE VII - Discussion
Particularités des cellules de STRASBURGER foliaires

7.1. Les plastes ... 96
7.2. Formations morulaires ... 96
7.3. Fibres cytoplasmiques ... 97
7.4. Plasmodesmes ... 99
7.4.1. Répartition et densité des plasmodesmes ... 99
7.4.2. Présence de callose au niveau des plasmodesmes ... 100
7.4.3. Rapports des plasmodesmes avec les systèmes membranaires de la cellule ... 100
7.4.4. Modifications structurales des membranes plasmodesmiques ... 101
7.4.5. Conclusions ... 103

CONCLUSIONS GENERALES

I - Caractères des cellules de STRASBURGER ... 105
II - Origine du tissu albumineux ... 107
III - Caractères cytochimiques des cellules de STRASBURGER ... 108
IV - Rôle du tissu de transfert ... 109
V - Conclusions ... 110

BIBLIOGRAPHIE ... 111

TABLE DES MATIERES.